

***Razvoj biorazgradivog aktivnog ambalažnog materijala na bazi hitozana: sinteza, optimizacija svojstava, karakterizacija i primena***

Doktorska disertacija

Mentor:  
***Prof. dr Vera Lazić***

Kandidat:  
***Dipl.inž. Nevena Hromiš***

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:

**RBR**

Identifikacioni broj:

**IBR**

Tip dokumentacije:

**TD**

Monografska publikacija

Tip zapisa:

**TZ**

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:

**VR**

Doktorska disertacija

Ime i prezime autora:

**AU**

Nevena Hromiš, dipl. inž.

Mentor:

**MN**

Dr Vera Lazić, redovni profesor

Naslov rada:

**NR**

**Razvoj biorazgradivog aktivnog ambalažnog materijala na bazi hitozana: sinteza, optimizacija svojstava, karakterizacija i primena**

Jezik publikacije:

**JP**

srpski (latinica)

Jezik izvoda:

**JI**

srpski/engleski

Zemlja publikovanja:

**ZP**

Srbija

Uže geografsko područje:

**UGP**

Vojvodina

Godina:

**GO**

2015

Izdavač:

**IZ**

autorski reprint

Mesto i adresa:

**MA**

21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: <b>FO</b>	broj poglavlja (6) / stranica (244) / tabela (18) /slika (67) /grafika (40) / referenci (437)
Naučna oblast: <b>NO</b>	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: <b>ND</b>	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: <b>PO</b> UDK	aktivna ambalaža, biorazgradivi materijali, hitozan, karakteristike, primena
Čuva se: <b>ČU</b>	U biblioteci Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: <b>VN</b>	-
Izvod: <b>IZ</b>	<p>Predmet doktorske disertacije je razvoj aktivnog jestivog omotača na bazi hitozana sa dodatkom etarskih ulja začinskog bilja i pčelinjeg voska, kao i njegova aplikacija u cilju produženja održivosti suve fermentisane Petrovačke kobasice.</p> <p>U cilju realizacije programa teze, formirane su tri osnovne grupe filmova: hitozan-etarsko ulje origana, hitozan-etarsko ulje kima i hitozan-etarsko ulje kima-pčelinji vosak. Paralelno sa pripremom filmova, proizvedeni su i odgovarajući kolagen-hitozan laminirani omotači. U pripremi filmova i omotača su primenjena dva vlažna postupka. Filmovi su dobijeni razlivanjem, a laminirani omotači premazivanjem filmogene emulzije preko kolagenog omotača. Tokom razvijanja, ispitivan je uticaj različitih parametara na svojstva dobijenih filmova: viskozitet i koncentracija hitozana, dodatak polietilenoksida kao kopolimera u film, dodatak različite koncentracije etarskog ulja, uslovi mešanja i temperature, kao i dodatak različite koncentracije pčelinjeg voska.</p> <p>Dobijeni filmovi i omotači su okarakterisani ispitivanjem osobina značajnih za primenu materijala, a to su fizičko-mehanička (debljina, zatezna jačina i izduženje pri kidanju), strukturna (ATR-FTIR spektrometrija i elektron skenirajuća mikroskopija), fizičko-hemijska (sadržaj vlage, bubrenje, rastvaranje), barijerna (propustljivost gasova i brzina propustljivosti vodene pare)</p>

svojstva i biološka aktivnost (antioksidativna i antimikrobna delovanja). Na osnovu detaljne karakterizacije, odabrani su filmovi i omotači optimalnih svojstava za primenu u zaštiti Petrovačke kobasice tokom skladištenja.

Ispitano je dejstvo premaza na očuvanje kobasice sa i bez dodate komercijalne i autohtone starter kulture. Efekat primene premaza izučavan je ispitivanjima parametara kvaliteta Petrovačke kobasice i to, praćenjem promene sadržaja vlage, vrednosti pH, boje, oksidacije lipida, kao i senzorne ocene mirisa i ukusa ove kobasice tokom skladištenja.

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da je sintetisan aktivan jestivi premaz na bazi hitozana optimizovanih barijernih, fizičko-hemijskih, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava. Sintetisani premaz ima manju brzinu propustljivosti vodene pare, uz očuvanu nisku propustljivost za gasove, smanjenu osetljivost na delovanje vlage i izraženiju antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Upkos optimizovanim barijernim svojstvima za vodenu paru, hitozanski premaz sa dodatkom etarskih ulja i/ili pčelinjeg voska nije imao efekta u očuvanju sadržaja vlage suve fermentisane kobasice tokom skladištenja. Ispitivani premazi su doprineli očuvanju boje preseka kobasice, ali ovaj efekat nije bio potpuno izražen kod svih tipova kobasice i svih premaza. Sva tri parametra za praćenje oksidativnih promena u kobasici ukazuju na to da je nanošenjem hitozanskog premaza sa etarskim uljem origana ili kima i pčelinjim voskom, kobasica efikasno zaštićena od nepoželjnih oksidativnih promena. Između eksperimenata se može povući paralela, da hitozanski premaz pokazuje zaštitni efekat prema senzornom profilu mirisa i ukusa, do blizu 5 meseci skladištenja. Na ovom nivou razvoja premaza, on se može preporučiti kao pomoćan ambalažni materijal.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

**DP**

11.10.2013.

Datum odbrane:

**DO**

17.07.2015.

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

**KO**

Dr Natalija Džinić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik,

Dr Vera Lazić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta, Novi Sad, mentor,

Dr Dragoljub Novaković, redovni profesor Fakulteta tehničkih nauka, Novi Sad, član,

Dr Svetlana Živanović, redovni profesor Department of Food Science and Technology, The University of Tennessee, Knoxville, TN, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:

**ANO**

Identification number:

**INO**

Document type:

**DT**

Monograph documentation

Type of record:

**TR**

Textual printed material

Contents code:

**CC**

Ph. D Thesis

Author:

**AU**

Nevena Hromiš, M. Sc.

Mentor:

**MN**

Dr Vera Lazić, full professor

Title:

**TI**

**Development of biodegradable active packaging material from chitosan: synthesis, optimisation of properties, characterisation and application**

Language of text:

**LT**

Serbian (latinic)

Language of abstract:

**LA**

Serbian/English

Country of publication:

**CP**

Serbia

Locality of publication:

**LP**

Vojvodina

Publication year:

**PY**

2015

Publisher:

**PB**

Author's reprint

Publication place: Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1  
**PP**

Physical description: number of chapters (6) / pages (244) / tables (18) /figures  
**PD** (67)/graphs (40)/references (437)

Scientific field Biotechnical science  
**SF**

Scientific discipline Food engineering  
**SD**

Subject, Key words active packaging, biodegradable materials, chitosan,  
**SKW** application

UC

Holding data: Library of Faculty of Technology, University of Novi  
**HD** Sad

Note: -  
**N**

Abstract: The subject of the doctoral dissertation is  
**AB** development of active edible coating based on chitosan with added herb essential oils and beeswax, as well as its application for dry fermented sausage shelf life extension.

In order to realize the program of investigation, three basic groups of films were produced: chitosan-essential oil of oregano, chitosan-essential oil of caraway and chitosan-essential oil of caraway-beeswax. Simultaneously with the production of films, collagen-chitosan laminated casings were produced. In the production of films and laminated casings, two wet methods were applied. Films were produced by casting method, while laminated casings were produced by coating collagen casing with filmogenic emulsion. During production, the influence of different parameters on properties of produced films and casings was investigated: viscosity and concentration of chitosan, addition of poly (ethylene oxide) as copolymer in the films, addition of different concentration of essential oils, mixing and temperature conditions, as well as addition of different concentration of beeswax.

Produced films and laminated casings were

characterized by the investigation of properties that are important for material application, namely physical-mechanical (thickness, tensile strength and elongation at break), structural (ATR-FTIR spectrometry and scanning electron microscopy), physical-chemical (water content, swelling, solubility), barrier (gas permeability and water vapor transmission rate) properties and biological activity (antioxidative and antimicrobial activity). Based on detail characterization, films and casings with optimal properties were selected for application on Petrovac sausage with and without the addition of commercial or indigenous starter culture for preservation during storage.

The effect of coating application was analyzed based on the quality parameters of Petrovac sausage, namely: water content, pH value, color, lipid oxidation and sensory profile of taste and odor of the sausage during storage.

Based on presented results, it can be concluded that active edible coating based on chitosan was synthesized, with optimized barrier, physical-chemical, antioxidant and antibacterial properties. Synthesized coating has lower water transmission rate with preserved low gas permeability, lowered sensibility to humidity and more pronounced antimicrobial and antioxidant activity. Despite optimized water vapor barrier properties, chitosan coating with addition of essential oils and/or beeswax did not show the effect in preserving the water content in the sausage during storage. Investigated coatings contributed to the preservation of core color of the sausage, but this effect was not fully expressed in all types of sausages and coatings. All three parameters for investigation of oxidative changes in the sausage showed that chitosan coating with essential oils of oregano and caraway and beeswax efficiently preserved sausage from unwanted oxidative changes. Mutual conclusion from the experiments is that chitosan coating shows preservative effect on the sensory profile of taste and odor till approximately 5 months of storage. On this level of coating development, it can be recommended as auxiliary packaging material.

Accepted on Scientific Board on:  
AS

11.10.2013.



Defended:

17.07.2015.

**DE**

Thesis Defend Board:


**DB**

Dr Natalija Džinić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik,

Dr Vera Lazić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta, Novi Sad, mentor,

Dr Dragoljub Novaković, redovni profesor Fakulteta tehničkih nauka, Novi Sad, član,

Dr Svetlana Živanović, redovni profesor Department of Food Science and Technology, The University of Tennessee, Knoxville, TN, član

The background of the page is a soft-focus image of pink flowers, likely cherry blossoms, with several butterflies fluttering around. The butterflies are in various colors, including blue, green, and white. The overall tone is light and natural.

*Neizmernu zahvalanost dugujem svom mentoru prof. dr Veri Lazić na nesebičnom angažovanju i pomoći tokom celokupnog rada na disertaciji, velikom znanju, dragocenim savetima, strpljenju, posvećenom vremenu i ogromnoj podršci tokom čitavog perioda naše saradnje. Moja je velika sreća što sam svoj profesionalni put, od prvog dana rada u nauci, laboratoriji i nastavi, gradila uz Vaše mentorstvo.*

*Srdačno se zahvaljujem prof. dr Nataliji Džinić na razumevanju tokom pisanja disertacije, korisnim savetima i sugestijama, kao i na lepoj saradnji i ukazanom poverenju u zajedničkom naučnom radu. Zahvaljujem se prof.dr Ljiljani Petrović na podršci i saradnji u planiranju i izvođenju dela eksperimenata koji su deo ove disertacije. Zahvaljujem se prof.dr Dragoljubu Novakoviću i prof.dr Svetlani Živanović na izuzetnoj časti koju su mi ukazali svojim učešćem u komisiji za ocenu i odbranu doktorske disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem kolegama sa predmeta Ambalaža i pakovanje na saradnji, druženju i podršci, kao i na lepim trenucima koje smo podelili kroz godine. Zahvaljujem se, takođe i dragim kolegama sa Tehnologije mesa na divnoj saradnji. Koristim ovu priliku da se najsrdačnije se zahvalimi svim drugim kolegama sa Tehnoškog fakulteta na saradnji i pomoći.*

*Beskrajno sam zahvalna porodicama Krkić i Hromiš na ljubavi, podršci, strpljenju i razumevanju, a mojim najdražima Zvonimiru i Veri od srca posvećujem ovu doktorsku disertaciju.*

## Spisak publikacija proisteklih neposredno iz rada na doktorskoj disertaciji:

1. **Krkić, N.**, Šojić, B., Lazić, V., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., Tomović, V. (2013). Lipid oxidative changes in chitosan-oregano coated traditional dry fermented sausage Petrovská klobása, *Meat Science*, 93 (3), 767-770.
2. **Krkić, N.**, Šojić, B., Lazić, V., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., Tomović, V., Džinić, N. (2013). Effect of chitosan-caraway coating on lipid oxidation of traditional dry fermented sausage, *Food Control*, 32 (2), 719-723.
3. **Hromiš, N.**, Lazić, V., Markov, S., Vaštač, Ž., Popović, S., Šuput, D., Džinić, N., Velićanski, A., Popović, Lj. (2015). Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. *Journal of Food Engineering*, 158, 86–93.
4. **Krkić, N.**, Lazić, V., Petrović, Lj., Gvozdrenović, J., Pejić, D. (2012). Properties of Chitosan-Laminated Collagen Film, *Food Technology and Biotechnology*, 50 (4), 483-489.
5. **Krkić, N.**, Lazić, V., Savatić, S., Šojić, B., Petrović, Lj., Šuput, D. (2012). Application of chitosan coating with oregano essential oil on dry fermented sausage, *Journal of Food and Nutrition Research*, 51 (1), 60-68.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Cilj disertacije.....	3
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	4
2.1. Aktivno pakovanje.....	4
2.2. Biofilmovi.....	5
2.2.1. Jestivi biofilmovi.....	7
2.2.2. Jestivi biofilmovi na bazi polisaharida.....	8
2.3. Hitin i hitozan.....	11
2.3.1. Nativna konformacija molekula hitozana.....	15
2.3.2. Konformacije hitozana u njegovim solima.....	18
2.3.3. Hitozanski biofilmovi.....	21
2.4. Kompozitni biofilmovi.....	21
2.4.1. Filmogena emulzija.....	22
2.5. Postupci dobijanja biofilmova.....	27
2.6. Karakterizacija biofilmova.....	29
2.6.1. Mehanička svojstva biofilmova.....	29
2.6.2. Fizičko-hemijska svojstva biofilmova.....	37
2.6.2.1. Sadržaj vlage, bubrenje i rastvaranja.....	37
2.6.2.2. Boja.....	38
2.6.3. Barijerna svojstva biofilmova.....	38
2.6.4. Strukturna svojstva biofilmova.....	42
2.6.4.1. ATR-FTIR spektroskopija.....	42
2.6.4.2. Elektron skenirajuća mikroskopija (SEM).....	42

2.6.5. Antioksidativna aktivnost hitozana i hitozanskog filma.....	43
2.6.5.1. Antioksidansi, definicija, podela i testovi za određivanje antioksidativne aktivnosti.....	43
2.6.5.2. Lipidna peroksidacija u hrani.....	46
2.6.5.3. Antioksidativna aktivnost hitozana.....	51
2.6.5.4. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja biljaka.....	58
2.6.6. Antimikrobna aktivnost hitozana, hitozanskih biofilmova i etarskih ulja biljaka.....	62
2.7. Primena jestivih filmova u prehrambenoj industriji.....	68
2.8. Primena hitozanskih omotača i filmova za pakovanje ribe, mesa i njihovih proizvoda.....	69
2.9. Suve fermentisane kobasice.....	74
2.9.1. Proces proizvodnje suvih fermentisanih kobasica.....	75
2.9.2. Petrovačka kobasica ("Petrovská kolbása").....	78
2.9.3. Pakovanje fermentisanih kobasica.....	78
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>82</b>
3.1. Materijal.....	82
3.1.1. Priprema biofilmova.....	82
3.1.1.1. Priprema hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja origana i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača.....	82
3.1.1.2. Priprema hitozanskog biofilma uz dodatak etarskog ulja kima i odgovarajućeg laminiranog kolagenih omotača.....	83
3.1.1.3. Priprema hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja kima i pčelinjeg voska i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača.....	83
3.1.2. Proizvodnja Petrovačke kobasice ("Petrovská kolbása") i njena zaštita primenom hitozanskih premaza.....	84
3.2. Metode ispitivanja.....	87
3.2.1. Ispitivanje fizičko-mehaničkih karakteristika biofilmova.....	87

3.2.1.1. Određivanje debljine.....	87
3.2.1.2. Određivanje zatezne jačine i izduženja pri kidanju.....	87
3.2.2. Ispitivanje strukturnih karakteristika biofilmova.....	87
3.2.2.1. ATR-FTIR spektrofotometrija.....	87
3.2.2.2. Elektron skenirajuća mikroskopija (SEM).....	87
3.2.3. Ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika biofilmova.....	88
3.2.3.1. Određivanje sadržaja vlage.....	88
3.2.3.2. Određivanje sposobnosti bubrenja.....	88
3.2.3.3. Određivanje rastvorljivosti.....	88
3.2.3.4. Određivanje boje.....	89
3.2.4. Ispitivanje barijernih svojstava biofilmova.....	89
3.2.4.1. Određivanje propustljivosti gasova.....	89
3.2.4.2. Brzina propustljivosti vodene pare.....	90
3.2.5. Ispitivanje antioksidativnog potencijala biofilmova u rastvoru DPPH radikala...	90
3.2.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti biofilmova.....	90
3.2.7. Parametri kvaliteta Petrovačke kobasice (" <i>Petrovska kolbasa</i> ")......	91
3.2.7.1. Sadržaj vlage.....	91
3.2.7.2. Vrednosti pH.....	91
3.2.7.3. Instrumentalno određivanje boje.....	91
3.2.7.4. Masnokiselinski sastav.....	91
3.2.7.5. Sadržaj malondialdehida (TBARS test).....	92
3.2.7.6. Sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida.....	92
3.2.7.7. Senzorna analiza profila mirisa i ukusa.....	93
3.2.8. Statistička obrada podataka.....	93

<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	94
4.1. Karakterizacija i primena hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja origana i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača.....	95
4.1.1. Uticaj viskoziteta hitozana, kao i dodatka drugog polimera na mehanička i barijerna svojstva biofilmova.....	95
4.1.2. Karakterizacija hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja origana i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača.....	100
4.1.3. Primena hitozanskog premaza uz dodatak etarskog ulja origana u zaštiti Petrovačke kobasice ("Petrovská kolbása").....	120
4.2. Karakterizacija i primena hitozanskog biofilma sa dodatkom etarskog ulja kima i odgovarajućeg laminiranog kolagenog omotača.....	133
4.2.1. Karakterizacija hitozanskog biofilma sa dodatkom etarskog ulja kima i odgovarajućeg laminiranog kolagenog omotača.....	134
4.2.2. Primena hitozanskog premaza sa dodatkom etarskog ulja kima u zaštiti Petrovačke kobasice ("Petrovská kolbása").....	140
4.3. Karakterizacija i primena hitozanskih biofilmova sa dodatkom etarskog ulja kima i pčelinjeg voska i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača.....	151
4.3.1. Uticaj koncentracije hitozana na svojstva biofilma.....	151
4.3.2. Karakterizacija hitozanskih biofilmova sa dodatkom etarskog ulja kima i pčelinjeg voska i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača.....	153
4.3.3. Primena hitozanskog premaza sa dodatkom etarskog ulja kima i pčelinjeg voska u zaštiti Petrovačke kobasice ("Petrovská kolbása").....	181
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	192
<b>6. LITERATURA</b> .....	197
<b>PRILOZI</b> .....	232

## 1. UVOD

Sintetski polimeri su postali veoma značajni od početka njihovog razvoja tokom Drugog svetskog rata do danas. Prva značajna moderna komercijalna plastika se pojavila 1940-ih godina. Primena sintetskih polimera je unela revolucionarne izmene u sferi ambalažne industrije. Polimeri na bazi nafte, kao što su: polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(etilen tereftalat) (PET) i poli(vinil-hlorid) (PVC) su brzo doživeli široku primenu u oblasti ambalaže, zahvaljujući velikom broju pozitivnih osobina, kao što su: fleksibilnost, čvrstoća, mala relativna masa u odnosu na upakovani proizvod, obradivost i niska cena (Goddard, 1990).

Gotovo svi prehrambeni proizvodi, kako sveži, tako i prerađeni, se pakuju u neku vrstu ambalaže, tokom proizvodnje, prerade, manipulacije, skladištenja, pa sve do konzumacije (Anker, 2000). Svha ambalaže je da zaštiti upakovani sadržaj od spoljnih uticaja tokom distribucije, transporta i skladištenja, u deklarisanom roku upotrebe (Curaković *i sar.*, 1992). Upotreba ambalažnih materijala i ambalaže na bazi sintetskih polimera obezbeđuje mnoge pogodnosti, malu relativnu masu ambalaže, dobra fizička i mehanička svojstva, širok spektar dizajna uz cene koje pogoduju, kako industriji, tako i potrošačima. Masovna upotreba ovih polimera je dovela do ekoloških problema zbrinjavanja velike količine nerazgradivog plastičnog ambalažnog otpada. Pritom se svi ovi materijali proizvode iz neobnovljivih sirovina. Tri osnovne strategije za zbrinjavanje plastičnog otpada su: spaljivanje, reciklaža i odlaganje na deponije (Lazić *i sar.*, 2009). Broj i kapacitet deponija je ograničen, a reciklažni sistem skup i ograničen, dok je problem zagađivanja vazduha spaljivanjem otvoren. Navedeni faktori, zajedno sa podizanjem ekološke svesti stanovništva i novom državnom regulativom o ambalaži i ambalažnom otpadu su uticali da plastična industrija počne da traga za ekološki prihvatljivim rešenjima. Potreba za održanjem ili unapređenjem kvaliteta upakovane hrane, uz smanjenje količine nastalog ambalažnog otpada, su doprineli, između ostalog, intenzivnom istraživanju biorazgradivih i jestivih ambalažnih materijala iz obnovljivih izvora tokom poslednje dve decenije (Lazić i Novaković, 2010). Upotrebom ovih materijala, donekle se smanjuje problem količine ambalažnog otpada, a kao sirovina se favorizuje biomasa i agro-industrijski otpad, kao i otpad iz same prehrambene industrije. Upotrebom ovakvih sirovina, pored dobijanja jeftine sirovine za proizvodnju materijala, donekle se smanjuje i količina otpada agro i prehrambene industrije i umanjuje problem njegovog zbrinjavanja (Lazić i Novaković, 2010; Olabarrieta, 2005). Upotreba biopolimera je bila prisutna još u drevnom Egiptu i staroj Kini, ali kasnije se njihov razvoj zaustavio zbog velike komercijalizacije sintetskih polimera i danas je, izuzev celuloze, upotreba biopolimernih ambalažnih materijala izuzetno ograničena zbog njihove visoke cene i lošijih fizičko-mehaničkih i barijernih svojstava (pre svega prema vodenoj pari). Ipak, istraživanja na ovom polju su mnogobrojna i razvoj savremenih načina proizvodnje i prerade (savremene tehnike polimerizacije i mešanja) dovodi do snižavanja cene i optimizacije osobina biopolimera (Olabarrieta, 2005).

Osnovna funkcija ambalaže je da prihvati proizvod i štiti ga do upotrebe, a uz ovu funkciju ambalaža služi kao sredstvo komunikacije sa potrošačima (Curaković *i sar.*, 1992). Osnovnu ulogu, prihvatanja i očuvanja proizvoda, ambalaža treba da izvrši na ekonomski



prihvatljiv način za proizvođača i potrošača, uz minimiziranje ekološkog opterećenja. Ambalaža štiti proizvod dvosmerno. Sa jedne strane ograničava delovanje spoljašnjih faktora na upakovan sadržaj, štiteći od uticaja svetlosti (UV, IC zračenje), gasova (kiseonika, ugljendioksida), vlage, mikroorganizama, insekata, glodara i drugih spoljašnjih uticaja, dok sa druge strane, ambalaža čuva svojstva proizvoda, onemogućavajući gubitak vlage, arome i narušavanja gasne atmosfere. Pored navedenog, ambalaža štiti proizvod i od fizičkog i mehaničkog oštećenja (Lazić i Novaković, 2010). Pored tradicionalne ambalaže koja štiti svojstva proizvoda pasivno, bez direktne interakcije sa njim, u ekspanziji je i razvoj aktivnih sistema pakovanja. Pod pojmom "aktivna" ambalaža, definiše se material koji je dizajniran da otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbuje iz hrane sa ciljem produženja održivosti hrane, kao i održavanja ili poboljšanja uslova pakovanja. Najpoznatije i najčešće korišćene tehnologije aktivnog pakovanja u industriji hrane su emiteri (antimikrobnih agenasa, antioksidativnih agenasa, etilena i CO<sub>2</sub>) i apsorberi (vezuju etilen, vlagu, CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>). Aktivne komponente: emiteri ili apsorberi se mogu primeniti u obliku kesice/kapsule koja se ubacuje u ambalažu ili se mogu inkorporirati u sam ambalažni materijal. Ovde biopolimeri nalaze značajnu primenu kao aktivni ambalažni materijali, tako što su sami filmovi aktivni (antimikrobna ili antioksidativna svojstva) ili se u biofilme inkorporiraju prirodni i sintetski aktivni agensi radi kontrolisanog otpuštanja u proizvod (Hartley, 2013).

Hitozan je filmogeno jedinjenje koje se dobija iz otpada prehrambene industrije, a pritom pokazuje antimikrobna i antioksidativna svojstva, te se može razmatrati u svetlu prirodnog biorazgradivog aktivnog materijala (Nadarajah, 2005). U prilog upotrebe hitozana za izradu aktivnih jestivih filmova u prehrambenoj industriji se mogu navesti sledeća svojstva ovog biopolimera: odobren je kao aditiv u prehrambenoj industriji u mnogim državama, ima sposobnost formiranja filmova dobrih barijernih svojstava za gasove, pokazuje antimikrobna i antioksidativna svojstva, tri funkcionalne grupe omogućavaju različite modifikacije molekula u cilju poboljšanja osobina, izvor je obnovljiva sirovina, koja je pritom i otpad iz prehrambene industrije, nastali jestivi filmovi se mogu konzumirati zajedno sa proizvodom ili se odbacuju kao biorazgradiva ambalaža (Chhabra, 2004; Hammond, 2004). Ono na čemu je potrebno raditi je: poboljšanje mehaničkih svojstava, propustljivosti za vodenu paru, sniženju cene hitozana (optimizacijom u procesu proizvodnje, uvođenjem alternativnih sirovina u komercijalnu proizvodnju, npr. plesni). Kombinacija prirodnih antimikrobnih i antioksidativnih supstanci: hitozana i etarskih ulja biljaka može dati odlične rezultate. Inkorporiranjem etarskih ulja u hitozanski film usporava se isparavanje aktivnih komponenti, a hidrofobna priroda ulja može doprineti poboljšanju mehaničkih i barijernih karakteristika filma (Chi, 2004; Olabarrieta, 2005).

Petrovačka kobasica je tradicionalna suva fermentisana kobasica iz Srbije, zaštićena imenom porekla. Ovaj proizvod karakteriše nekontinuirana proizvodnja u individualnim seoskim domaćinstvima i nedovoljna prisutnost na tržištu. Za njenu konkurentnost i širi plasman na tržištu neophodna je kontinuirana proizvodnja, kao i efikasno rešenje za očuvanje kvaliteta za duži vremenski period skladištenja. Jedan od mogućih pristupa u rešavanju pitanja očuvanja kvaliteta tokom skladištenja je prirodno, ekološki podobno rešenje u vidu upotrebe

jestivog, biorazgradivog aktivnog filma na bazi hitozana, uz dodatak etarskih ulja biljaka (Krkić *i sar.*, 2013).

### 1.1. Cilj disertacije

Cilj doktorske disertacije je razvoj aktivnog jestivog premaza na bazi hitozana, kao i njegova primena u cilju produženja održivosti suvih fermentisanih kobasica. Cilj je realizovan sintezom više različitih modela hitozanskih biofilmova i kolagen-hitozan laminiranih omotača sa dodatkom aktivnih i pomoćnih komponenti. Dodatkom etarskih ulja origana i kima, kao i pčelinjeg voska modifikovan je sastav filmogenog rastvora za sintezu biofilmova i kolagen-hitozan laminiranih omotača. Karakterizacija svih tipova filmova i omotača izvršena je ispitivanjima fizičko-mehaničkih svojstava (debljina, zatezna jačina i izduženje pri kidanju), strukturnih osobina (elektronskenirajuća mikroskopija-SEM i ATR-FTIR spektroskopija), fizičko-hemijskih karakteristika (sadržaj vlage, rastvorljivost, bubrenje i boja filma), barijernih svojstava (propustljivost gasova i vodene pare) i biološke aktivnosti filmova (antioksidativna i antimikrobna aktivnost). Cilj navedenih modifikacija hitozanskih biofilmova i kolagen-hitozan laminiranih omotača je optimizacija mehaničkih, fizičko-hemijskih i barijernih svojstava filmova, kao i unapređenje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti hitozanskog filma i laminiranog omotača, odnosno dobijanje aktivnog jestivog ambalažnog materijala optimalnih svojstava.

Mogućnost primene razvijenih i okarakterisanih aktivnih jestivih premaza na bazi hitozana ispitana je primenom na suhu fermentisanu Petrovačku kobasicu. Efekat primene premaza izučavan je ispitivanjima parametara kvaliteta Petrovačke kobasice i to, praćenjem promene sadržaja vlage, vrednosti pH, boje, oksidacije lipida, kao i senzorske ocene mirisa i ukusa ove kobasice tokom skladištenja.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Aktivno pakovanje

Tradicionalni način pakovanja (pasivno pakovanje), s obzirom na način distribucije i skladištenja proizvoda, ima svoja ograničenja u zaštiti proizvoda. Zahtevi za povećanjem trajnosti proizvoda, kao i negativan stav potrošača prema konzervansima doveli su do razvoja aktivnog pakovanja. Prema Odredbi Evropske Unije o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir sa hranom, koja je stupila na snagu 2004. godine (Regulation 1935/2004), dopušteno je uvođenje “aktivne” i “inteligentne” ambalaže, dok su dodatni zahtevi propisani specifičnim merama koje uključuju pozitivnu listu dopuštenih supstanci i/ili materijala. Pod pojmom “aktivna” ambalaža, definiše se materijal koji je konstruisan na način da otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbuje iz hrane sa ciljem produženja trajnosti ili održavanja ili poboljšavanja uslova pakovanja (Rooney, 1995). Navedeni novi tipovi ambalaže ne smeju menjati sastav ili organoleptička svojstva hrane ili rezultirati informacijama koje bi mogle zavarati potrošača. Aktivna ambalaža ne sme sadržavati supstance s namerom prikrivanja procesa kvarenja hrane.

Tehnike aktivnog pakovanja se dele na (Lazić *i sar.*, 2008): apsorpcione sisteme, otpuštajuće sisteme i ostale sisteme.

-Apsorbicioni sistemi apsorbuju neželjene materije, odnosno jedinjenja, kao što su kiseonik, ugljen-dioksid, etilen, vlaga, laktoza, strani mirisi ili holesterol.

-Druga tehnika aktivnog pakovanja je primena otpuštajućih sistema koji aktivno dodaju ili emituju jedinjenja u upakovanu hranu ili u slobodan prostor u ambalaži, kao što su ugljen-dioksid, antioksidansi i antimikrobni agensi.

-Ostali sistemi mogu imati razne zadatke, kao što su, samo-zagrevanje, samo-hlađenje i konzerviranje.

Aktivno se pakovanje prvi put pominje pre nekoliko decenija, kada je započela masovna upotreba desikanata za pakovanje suvih proizvoda. Desikant, koji se nalazio u hidro-poroznoj kesici, upijao je vodenu paru iz proizvoda putem transmisije kroz strukturu pakovanja. Najpoznatija i najčešće korišćena tehnologija aktivnih pakovanja u industriji hrane su specijalna pakovanja koja služe za eliminaciju kiseonika iz unutrašnjosti pakovanja (“oxygen scavenger”). Najčešće se u ovu svrhu koristi vitamin E, kao i butilovani hidoksianizoli i hidrokstitolueni (BHA/BHT). Tokoferoli nisu isparljive supstance, pa još uvek ne mogu izbaciti iz upotrebe butilovane hidoksianizole i hidrokstitoluene (BHA/BHT), koji migriraju iz pakovanja u hranu i stvaraju površinski antioksidativni efekat. Cilj ovih pakovanja je da se spreče, ili u najvećoj mogućoj meri redukuju, oksidacioni procesi, što uključuje i druge mere za sprečavanje naknadnog ulaska kiseonika u pakovanje, kao što su upotreba filmova sa dobrim barijernim svojstvima, tehnika dobrih varova itd. Kiseonik nije jedini faktor koji utiče na kvalitet upakovane hrane. I drugi faktori značajno utiču na pogoršanje održivosti proizvoda, naročito porast ili smanjenje vlage, izloženost svetlosti, mikrobiološki status, kao i enzimska aktivnost samog proizvoda. Slično antioksidansima,

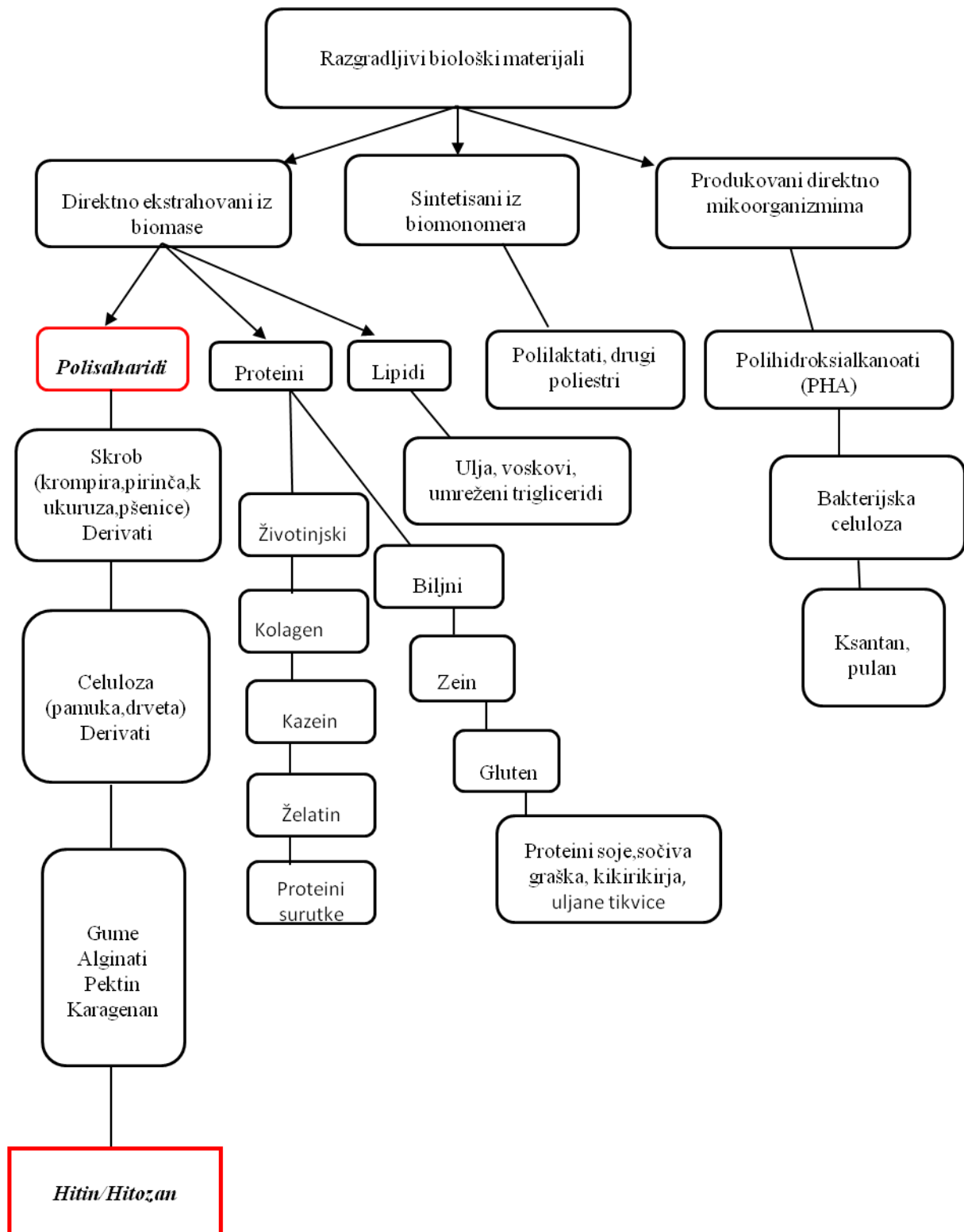
naučna i stručna zajednica već duži niz godina pokušava da iskoristi barijerne filmove kao rezervoar za antimikrobna pakovanja. Do sada se često koristio vitamin C za sprečavanje rasta plesni kod upakovane suve hrane. Međutim, usled toksičnosti pojedinih novosintetisanih jedinjenja, upotreba ovih pakovanja na tržištu je veoma usporena (Velebit i Petrović, 2012; Jovanović i Džunuzović, 2011).

Rastući zahtevi potrošača za hranom bez hemijskih konzervanasa usmerili su mnoga istraživanja u smeru pronalaženja prirodnih materija koje se mogu koristiti u očuvanju hrane. U ovom kontekstu, ambalaža na bazi biopolimera dobija na značaju, a prirodne supstance sa izraženim antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima, kao što su etarska ulja biljaka, kao i prirodni biopolimeri posebno skreću pažnju. Prirodni biopolimeri mogu služiti kao nosači aktivnih komponenti, kao što su etarska ulja biljaka u cilju njihovog postupnog otpuštanja u hranu tokom skladištenja, a mogu i sami pokazivati aktivna svojstva u zaštiti hrane. Antioksidativna svojstva su zapažena kod većeg broja biopolimernih materijala na bazi hidrokoloida, dok je kod biopolimera hitozana pored antioksidativne dokazana i antimikrobna aktivnost. Ovako dizajnirana ambalaža je, pored osnovne funkcije očuvanja proizvoda, aktivna, prirodna, ekološki prihvatljiva i biorazgradiva (Lazić i Novaković, 2010; Popović, 2013; Hromiš *i sar.*, 2014).

## 2.2. Biofilmovi

Materijali koji se koriste za proizvodnju biorazgradivih filmova se mogu podeliti na prirodne (biopolimeri) i sintetičke polimere. Prirodni polimeri (biopolimeri) su proizvedeni od obnovljivih ili prirodnih resursa, dok se sintetički dobijaju iz fosilnih ili neobnovljivih izvora, tj. iz nafte (Flieger *i sar.*, 2003).

Biofilmovi predstavljaju prirodne materijale koji se u relativno kratkom vremenskom periodu razlažu na ugljen dioksid, vodu, metan ili biomasu, delovanjem kiseonika, mikroorganizama i/ili enzima. Filmovi mogu biti jestivi i/ili biorazgradivi, u zavisnosti od formulacije, metode formiranja, i uslova formiranja. Kada se za proizvodnju filmova koriste hidrokoloidi ili lipidi za humanu ishranu i prehrambeni aditivi (npr. plastifikatora, kiseline ili baze, soli i enzimi), a usled termičkog tretmana, modifikacije pH, dodatka soli, enzimske modifikacije itd., dolazi samo da promene u konformaciji i načinu pakovanja hidrokoloida i gubitka vode, dobijeni filmovi spadaju u grupu jestivih. Jestivi filmovi su i biorazgradivi. Međutim, jestivost se gubi kada hidrokolid ili lipid reaguje sa nejestivim hemikalijama, pre ili za vreme formiranja filma (npr. hemijsko ugrađivanje različitih molekula), ili kada se dodaju nejestive komponente u film (Krochta i De Mulder-Johnston, 1997). Izazov kojem moraju odgovoriti biorazgradivi filmovi je da zadrže svoje osobine i da obavljaju svoju funkciju bezbedno i efikasno u željenom vremenskom periodu. Proces biorazgradnje treba da otpočne tek posle isteka roka upotrebe upakovanog proizvoda ili određenog vremena primene filma (Krochta i De Mulder-Johnston, 1997; Lazić i Novaković, 2010).



Slika 1. Podela biopolimera prema poreklu i načinu proizvodnje

Biofilmovi najčešće predstavljaju smešu polimera velikih molekulskih masa, rastvarača i plastifikatora. Različiti dodaci, kao što su antimikrobne komponente, antioksidansi, pojačivači ukusa, boje i dr. mogu biti inkorporirani, u cilju poboljšanja njihove funkcije. Plastifikatori i drugi aditivi se kombinuju sa filmogenim biopolimerima u cilju

modifikacije fizičkih karakteristika filma. Kod jestivih biorazgradivih filmova, vrsta rastvarača je ograničena na vodu i etanol (Giancone, 2006; Popović, 2013).

Biopolimeri se, prema poreklu i načinu proizvodnje, mogu podeliti na (van Tuil *i sar.*, 2000):

- 1) Polimere ekstrahovane/izolovane direktno iz biomase (celuloza, škrob, hitin i hitozan, kazein i gluten);
- 2) Polimere proizvedene klasičnim hemijskim sintezama od biomonomera (primer je polimlečna kiselina PLA, mada se teorijski, svi dosadašnji polimerni materijali mogu se zameniti ovim biopolimerima)
- 3) Polimere dobijene direktno iz prirodnih ili genetički modifikovanih organizama (polihidroksialkanoati PHA i bakterijska celuloza)

Šematski prikaz vrsta biopolimera dat je na *Slici 1.* (van Tuil *i sar.*, 2000; Popović, 2013).

### 2.2.1. Jestivi biofilmovi

Najpristupačniji i najviše eksploatisani biopolimeri, dobijeni iz morskih plodova, životinja i biljaka, u osnovi su lipidi i hidrokoloide. Za dobijanje jestivih biofilmova primenjuju se komponente klasifikovane u tri kategorije: hidrokoloide (proteini i polisaharidi), lipidi (masne kiseline, acilgliceroli i voskovi) i kompoziti (mogu biti kombinacija više hidrokoloida ili hidrokolida i lipida). Ove kombinacije biopolimera i lipida se pretežno koriste za proizvodnju jestivih biofilmova (van Tuil *i sar.*, 2000).

Hidrokoloide, proteini i polisaharidi predstavljaju molekule izraženih filmogenih karakteristika i imaju široku primenu za dobijanje biorazgradivih filmova. Filmovi na bazi hidrokoloida se mogu primenjivati kada barijera prema vodenoj pari nije ključna. Ovi filmovi imaju odlična barijerna svojstva prema gasovima i lipidima. Većina ima dobre mehaničke karakteristike pa se primenjuju za poboljšanje strukturnog integriteta lomljivih i krutih proizvoda. Većina, ne utiče na senzorska svojstva upakovanog proizvoda (hrane ili leka). Hidrokoloide se klasifikuju prema sastavu, naelektrisanju molekula i rastvorljivosti u vodi. Prema sastavu dele se na proteine i polisaharide. Za formiranje filmova, od velikog značaja je i naelektrisanje hidrokoloida, pa su zato neki hidrokoloide npr. hitozan osetljivi na promenu vrednosti pH (Giancone, 2006).

Polisaharidi su prirodni polimeri sačinjeni od monosaharidnih i/ili disaharidnih jedinica. Kao rezultat njihove strukture, osobine ovih filmova su: dobra barijera za ulja i kiseonik, ali u prisustvu vlage ova dobra svojstva se narušavaju usled hidrofilne prirode polimera. Polisaharidi i njihovi derivati imaju široku primenu u proizvodnji biorazgradivih filmova jer je veoma širok spektar sirovina za njihovu proizvodnju, sirovine su jeftine, a proizvodnja jednostavna i nema potrebe za upotrebom toksičnih rastvarača. To su, pre svih, alginati, pektini, hitozan, karagenani, škrob, hidrolizati skroba i derivati celuloze (van Tuil *i sar.*, 2000 i Janjarasskul and Krochta, 2010).

Proteini se, prema poreklu, mogu podeliti na proteine biljnog (gluten, zein, proteini soje, graška, kukuruza) i životinjskog porekla (kazein, kolagen, želatin, keratin). Proteini obuhvataju širok opseg polimernih materija koje pružaju strukturnu i biološku aktivnost biljkama i životinjama. Za razliku od polisaharida, proteini se sastoje od aminokiselina, povezanih peptidnim vezama. Zbog prisustva bočnih grupa vezanih za  $\alpha$ -ugljenikov atom, aminokiseline se međusobno povezuju, stvarajući veliki broj proteina, različite veličine, strukture i funkcije (Ou *i sar.*, 2005, Popović, 2013).

Lipidi se već dugi niz godina koriste kao zaštitni omotači, ali obzirom da oni nisu polimeri, nemaju sposobnost da grade koherentne samostalne filmove. Mogu da poboljšaju sjaj površine polimera i, pošto su uglavnom nepolarne supstance, poboljšavaju barijerna svojstva prema vodi. Voskovi, kao što su karnaube vosak i parafin, i razne vrste lipida iz povrća koriste se u komercijalne svrhe još od tridesetih godina XX veka, kao omotači svežeg voća i povrća, sireva i proizvoda od mesa. Generalno, filmovi na bazi voskova imaju najveći stepen otpornosti prema migraciji vlage u odnosu na sve druge lipidne i nelipidne filmove. Parafinski vosak je jedan od najefikasnijih barijera za vodenu paru, usled nedostatka polarnih grupa. Dobija se iz određenih frakcija tokom destilacije nafte. Koristi se kao prevlaka za voće, povrće i sireve. Karnauba vosak je proizveden u Brazilu iz listova palme. Koristi se za omotače voća i povrća. Ima najvišu tačku topljenja i specifičnu težinu od svih prirodnih voskova i dodaje se drugim voskovima da bi im se povećala temperatura topljenja, tvrdoća, žilavost i sjaj (Hernandez, 1994). Pčelinji vosak izlučuju medonosne pčele pri gradnji saća. Vosak se dobija nakon centrifugiranja meda iz saća otapanjem u toploj vodi, pari ili na suncu. Na sobnoj temperaturi je mek, ali na nižim temperaturama postaje veoma krt. Rastvara se u ulju i drugim voskovima (Hernandez, 1994). Filmovi na bazi voskova, masti i ulja se veoma teško primenjuju zbog svoje debljine i masne površine, a mogu imati i izražen ukus na mast. Mono-, di- i triacilgliceroli su mono-, di- i triestri glicerola sa masnim kiselinama i koriste se kao omotači. Ove filmove karakterišu nezadovoljavajuće senzorske osobine, mogućnost pucanja prilikom skladištenja u uslovima hlađenja i zamrzavanja, apsorpcija stranih mirisa, i zaostali neprijatan kiseli ili gorki ukus (van Tuil *i sar.*, 2000).

### 2.2.2. Jestivi biofilmovi na bazi polisaharida

Jestivi biofilmovi se međusobno razlikuju prema sirovini iz koje su proizvedeni. Vrsta preovlađujućeg molekula u mrežastoj strukturi biopolimera određuje osnovne fizičko-mehaničke i barijerne osobine, pa time i primenu za pakovanje određenih vrsta proizvoda. Najčešći filmovi na bazi polisaharida koji se koriste u proizvodnji ambalažnih materijala su filmovi na bazi amilaze, alginata, karagenana, agara, dekstrana, pektina, karboksimetilceluloze, hidroksipropil celuloze i drugih celuloznih estara (Lazić i Novaković, 2010; Galić, 2010, Dhanapal *i sar.*, 2012).

**Amilaza** je linearna frakcija skroba i ona formira koherentne, relativno jake filmove, u odnosu na amilopektinske filmove, koji su krti i heterogeni. Filmovi proizvedeni od hidroksipropilnih derivata skroba sa visokim sadržajem amilaze su slaba barijera razmeni vlage, ali imaju veoma nisku propustljivost kiseonika pri niskoj relativnoj vlažnosti vazduha. Skrobni filmovi se tradicionalno koriste za zaštitu orašastih proizvoda. Hidroksipropilirani amilozni

skrobni filmovi su fleksibilni, transparentni, otporni na masnoće, termoskupljajući i relativno nepropusni za gasove. Pored ovih dobrih svojstava, ovi filmovi su osetljivi na vlagu.

**Alginati** se ekstrahuju iz smeđih algi iz porodice *Phaeophyta* i sastoje se od alginske kiseline, linearnog kopolimera D-manuronske i L-glukuronske kiseline. Natrijumov alginat je so alginatne kiseline ekstrahovane iz smeđih morskih trava. Formiranje filma koji može, ali i ne mora uključiti fazu geliranja, postiže se evaporacijom i umrežavanjem elektrolita ili injektovanjem u vodi topivih rastvora (koji ne otapaju alginat). Čvrstoća i propusnost filmova se može modifikovati dodatkom kalcijumovih soli (hlorida, acetata, laktata, tartarata, glukonata, sulfata, citrate). Premazi na bazi alginata nalaze čestu primenu u mesnoj industriji. Filmovi se proizvode evaporacijom vode iz tankog sloja rastvora alginata i impregniraju uljem i masnoćom radi poboljšanja barijernih svojstava prema vodi. Kalcijumovi joni se koriste kao agensi za umrežavanje koji pomoću jonske veze spajaju lance alginata. Održivost brzo smrznute ribe i mesa se može značajno produžiti ukoliko se proizvodi zaštite premazom kalcijum-alginata. Premaz se nanosi potapanjem mesa ili ribe (pre smrzavanja) prvo u rastvor natrijum-alginata, koji sadrži dekstrozu, a zatim u rastvor kalcijum-hlorida. Formiran premaz je čvrst, stabilan na promenu temperature, sprečava penetraciju kiseonika i razvoj oksidativne užeglosti. Jedan od poznatijih komercijalnih filmova (Flavor-Tex), dobijen geliranjem maltodekstrinskog rastvora natrijum alginata sa rastvorom kalcijum-hlorid-karboksimetil-celuloze, koristi se za zaštitu niza prehrambenih proizvoda. Ispitivanja su pokazala da se primenom navedenog premaza značajno smanjuje gubitak mase svežeg mesa (1.5%) tokom 24 sata u odnosu na kontrolno nezaštićeno meso (2.8%), dok je ukupni broj mikroorganizama na površini zaštićenog mesa bio nešto niži (Galić, 2009).

Polisaharidna guma **karagenan** se ekstrahuje iz crvenih algi, iz vrste poznate kao Irska mahovina (*Chondrus crispus*). Karagenan je kompleksna mešavina od najmanje pet različitih polimera na bazi galaktoze.

**Agar** je guma koja se dobija iz različitih vrsta crvenih algi iz klase *Rhodophyte* i takođe je polimer na bazi galaktoze. Agar formira jake gelatinozne strukture koje karakteriše tačka topljenja znatno viša od temperature formiranja gela. Agar i karagenan se koriste kao premazi za prehrambene proizvode sa ciljem suzbijanja rasta mikroba (kod mesa) i gubitka vlage (perad).

**Dekstrani** su gume dobijene mikrobiološkom fermentacijom saharoze, a sastavljeni su isključivo od  $\alpha$ -D-glukopiranoza povezanih različitim tipovima glikozidnih veza. Koriste se za očuvanja arome, boje i svežine hrane tokom skladištenja u uslovima hlađenja i zamrzavanja. Za zaštitu voća i orašastih proizvoda preporučuje se korišćenje dekstrinskih filmova (niske DE vrednosti, odnosno sadržaja redukujućih šećera izražen kao procenat D-glukoze na suhu materiju). Dekstrini imaju nešto kraće lance od dekstrana. Najčešće nastaju hidrolizom skroba. Fleksibilni i čvrsti filmovi dobijaju se evaporacijom (5 – 15)% vodenog rastvora maltodekstrina (DE:3). Otpornost na vodu im je slaba. Kukuruzni sirupi s niskim DE vrednostima (DE 28-38) smanjuju brzinu prelaza vodene pare celuloznog acetata. Dekstran se upotrebljava kao konzervans protiv gubitka vlage kod proizvoda kao što su škampi, meso, suvo voće, sir, maslac i smrznuta hrana. Pululani su strukturni polisaharidi koje proizvode



plesni *Aureobasidium pullulans* iz skroba. Pululan karakteriše dobra čvrstoća i elastičnost formiranog filma.

**Karboksimetil-celuloza, hidroksipropil-celuloza i drugi celulozni etri** koriste se za izradu filmova. Filmovi se sintetišu evaporacijom iz vodenih rastvora. Postupkom ekstruzije ili presovanja, mogu se dobiti proizvodi različitih oblika i dimenzija. Direktno prevlačenje hrane sprovodi se potapanjem u rastvor premaza. Dobijeni filmovi su čvrsti, prozirni, relativno otporni na vodu, masti, ulja i većinu nepolarnih organskih rastvarača. Značajna karakteristika filmova na bazi celuloze je usko područje rastvorljivosti u vodi. Većina ih je nerastvorljiva u vodi iznad 55 °C. Primenom odgovarajućeg plastifikatora moguće je proizvesti termoskupljajući film hidroksipropil-metil celuloze. Etri celuloze su polimerne supstance koje nastaju parcijalnom supstitucijom tri hidroksilne grupe u pozicijama 2, 3 i 6 monomera glukoze. Najrasprostranjeniji etri celuloze su metilceluloza, hidroksipropilceluloza, hidroksipropil-metilceluloza i karboksimetilceluloza. Sve ove vrste daju filmove veoma dobrih osobina. Koriste se za pakovanje hrane koju, pre svega, treba zaštititi od migracije kiseonika, masti i vode.

**Pektin** je kompleksna grupa strukturnih polisaharida biljnog porekla, koju uglavnom čini monomer D-galakturonska kiselina različitog stepena esterifikacije metil grupom. Kako ovaj film karakteriše visoka propustljivost za vodenu paru, za povećanu primenu suvog pektinskog filma ovaj nedostatak se može rešiti prevlačenjem lipidima.

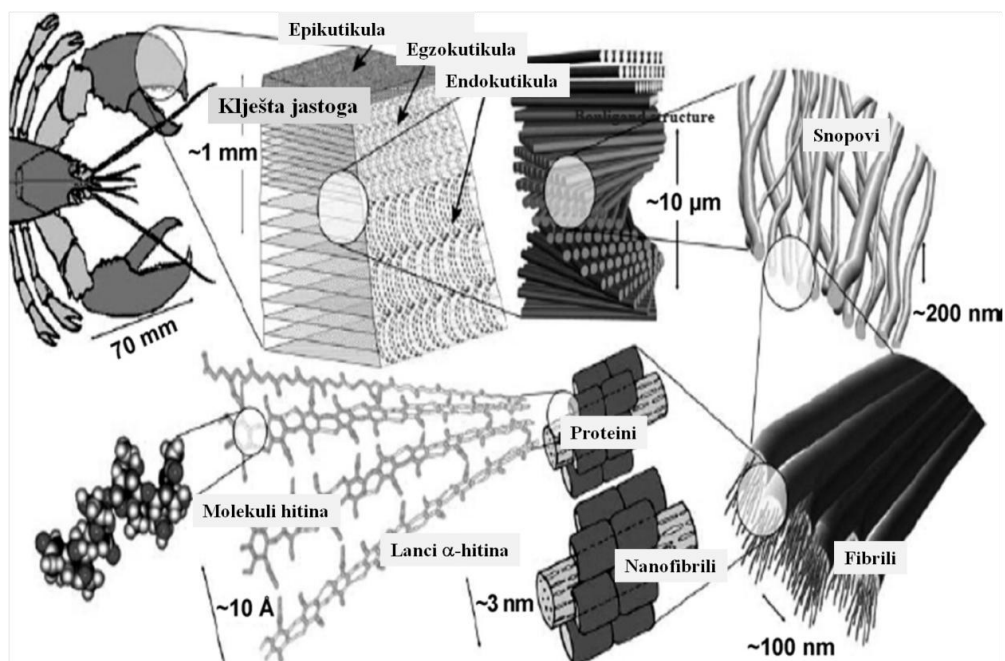
**Hitozan** je polu-prirodni polisaharid koji se dobija hemijskom modifikacijom hitina.

Postoji čitav niz aditiva koji se mogu koristiti u izradi jestivih filmova u svrhu poboljšanja zaštitnih, nutritivnih i senzorskih svojstava materijala. Zaštitna svojstva se mogu poboljšati dodatkom antimikrobnih agenasa ili antioksidanasa. Korišćenjem sloja premaza sa visokom koncentracijom antimikotičkih ili antioksidativnih agenasa moguće je održati izvorni integritet hrane ili, kao alternativa, moguće je koristiti manje količine aditiva. Takođe su učinjeni napor u razvijanju materijala koji će sprečiti mikrobnog kvarenje većih komada mesa upotrebom limunske kiseline i rastvora natrijum-hlorida u obliku spreja pri čemu se podešava aktivitet vode ( $a_w$ ) i vrednost pH površine mesa. Poboljšanje nutritivne vrednosti hrane može se postići prevlačenjem hrane odgovarajućim nutritivnim aditivima. Dodatkom boja, zaslađivača, kiselina ili soli u jestive filmove značajno se mogu poboljšati ne samo senzorska svojstva hrane, već se mogu ukloniti neugodni mirisi kod nekih jestivih filmova.

### 2.3. Hitin i hitozan

Hitin je osnovna strukturna komponenta egzoskeleta beskičmenjaka, kutikule insekata i ćelijskog zida gljiva (Slika 2). Naziv hitin potiče od grčke reči "hiton", što znači oklop. Smatra se drugim biopolimerom po rasprostranjenosti na Zemlji, posle celuloze. Hitin je linearan, visoko kristalan polisaharid, izgrađen od monomernih jedinica acetilglukozamina povezanih  $\beta$ -1,4glukozidnim vezama (Slika 3). Uloga hitina je analogna ulozi kolagena kod viših životinja i celuloze kod kopnenih biljaka. Biljke proizvode celulozu za izgradnju ćelijskih zidova, a insekti i ljuskari proizvode hitin za oklope (Pillai, 2009).

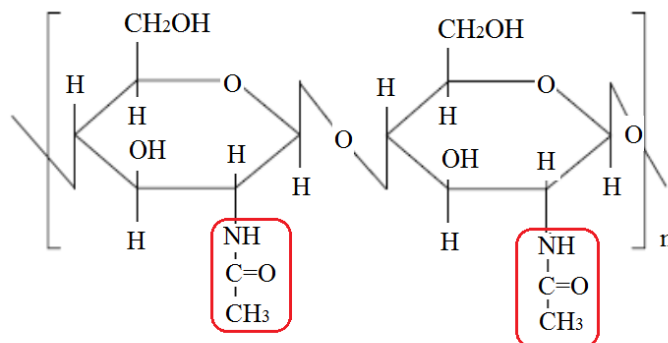
Zavisno od izvora hitina, do sada su identifikovana tri polimorfna oblika:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  hitin u čvrstom stanju (Slika 4). Najrasprostranjeniji polimorf je  $\alpha$ -hitin, koji je termodinamički stabilniji od  $\beta$ -oblika jer se rekristalizacijom iz rastvora, kao i biosintezom in vitro i enzimskom polimerizacijom uvek dobija  $\alpha$ -hitin.  $\beta$ -oblik se sreće u asocijaciji sa proteinima kod lignji, nekih vrsta crva, morskih algi i protozoa. Komercijalno, hitin se proizvodi iz otpada prehrambene industrije, sačinjenog od morskih ljuskara ( $\alpha$ -hitin).



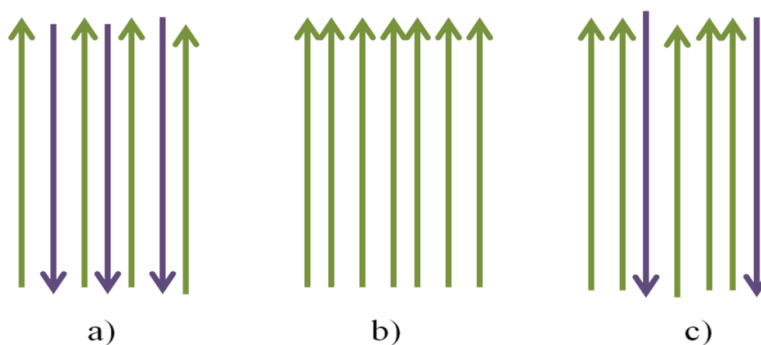
Slika 2. Hijerarhijska struktura kutikule kao prikaz uredene strukture hitina (prikaz iz Pillai, 2009)

Treći polimorf hitina koji se navodi u literaturi je  $\gamma$ -hitin, ali se pretpostavlja da on predstavlja izmenjenu varijantu  $\alpha$ - ili  $\beta$ -hitina, a ne pravi treći polimorfni oblik (Muzzarelli i Muzzarelli, 2005). Kod obe strukture,  $\alpha$  i  $\beta$  hitina, lanci hitina su organizovani u lamelama koje su usko povezane vodoničnim vezama između susednih listova ( $C-O \cdots NH$  veze) duž a-ose pojedinačne ćelije. Pored ovih veza, kod  $\alpha$ -hitina se javljaju i vodonične veze unutar listova između hidroksimetil grupa pojedinačnih lanaca (duž b-ose) (Aranaz, 2009). Kod  $\alpha$ -hitina makromolekuli imaju suprotnu, tj. antiparalelnu orijentaciju, kod  $\beta$ -hitina imaju istu, tj.

paralelnu orijentaciju, dok kod  $\gamma$ -hitina svaki treći lanac ima antiparalelnu orijentaciju. Šematski prikaz ove tri polimorfne strukture dat je na Slici 4.



Slika 3. Lanac hitina



Slika 4. Tri polimorfne konfiguracije hitina (a)  $\alpha$ -hitin, (b)  $\beta$ -hitin i (c)  $\gamma$ -hitin (Aranaz, 2009)

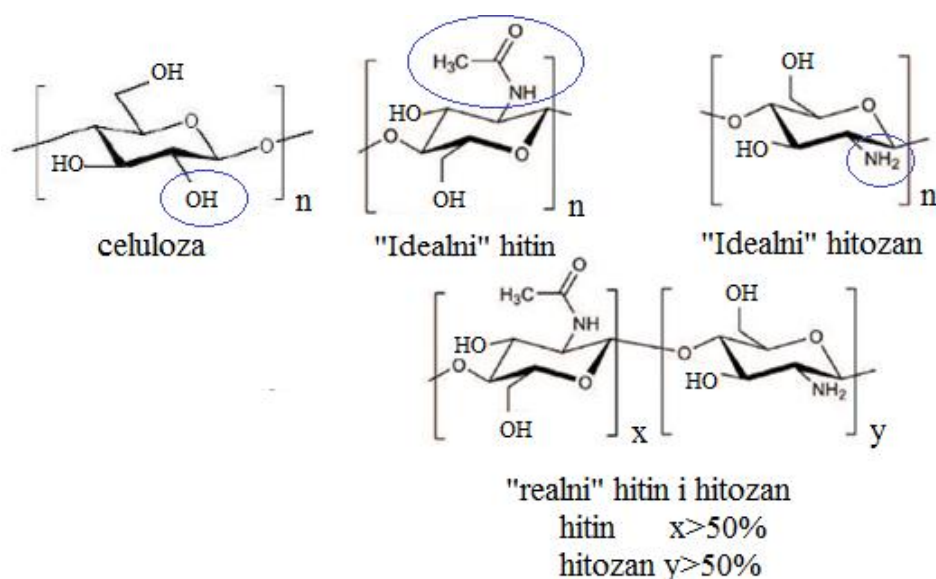
Hitin se i u prirodi javlja delimično deacetilovan (sa niskim sadržajem jedinica glukozamina), zavisno od sirovine iz koje je dobijen. Bez obzira na ovu činjenicu, oba alomorfa hitina,  $\alpha$  i  $\beta$ -hitin su nerastvorna u svim uobičajenim rastvaračima, nezavisno od prirodne varijabilnosti u stepenu kristalnosti (Rinuado, 2006). Da bi se postigla rastvorljivost hitina u vodenim rastvorima, neophodno je da stepen deacetilovanosti molekula bude oko 50% i da pritom acetil grupe budu ravnomerno raspoređene duž lanca (Rinuado, 2006).

Hitin ima nisku toksičnost i inertan je u gastrointestinalnom traktu sisara. Biorazgradiv je, pod uticajem hitinaza koje su široko rasprostranjene u prirodi, u bakterijama, plesnima i biljkama i digestivnom traktu mnogih životinja. Upotrebljava se u afinitetnoj hromatografiji za izradu kolona za izolovanje lecitina. Pokazano je da hitin i 6-O-karboksimetilhitin zaustavljaju razvoj tumornih ćelija kod miševa i stimulišu rezistentnost prema infekciji *E.Coli*. Hitin ubrzava zarastanje rana. Koristi se za imobilizaciju enzima i celih ćelija. Imobilizacija enzima ima primenu u prehrambenoj industriji za bistrenje voćnih sokova i u preradi mleka, gde se  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze ili invertaze nanose na hitin (Rinuado, 2006). Hitin se može upotrebljavati kao bisenzor, u tretiranju industrijskih zagađivača. Može se proizvoditi u obliku niti i filmova. Niti se koriste kao vezujuća sredstva u procesu proizvodnje papira, gde

dodatak od 10% n-izobutilhitin niti poboljšava silu kidanja papira (Rinuado, 2006). Osnovna primena hitinskog filma i niti je u medicinskoj i farmaceutskoj sferi, kao gaze za previjanje i kao materijala za kontrolisano otpuštanje leka. Hitin se koristi kao nosilac leka u obliku filma, gela ili praška zbog njegove mukoadhezivnosti. Još jedan primer primene je kompozitni materijal za ispunjavanje kostiju na bazi hidroksiapatita, hitina i hitozana, koji oformljava pastu koja vremenom stvrdnjava, koji se koristi za usmerenu regeneraciju tkiva kod periodontalnih defekata kostiju (Rinuado, 2006).

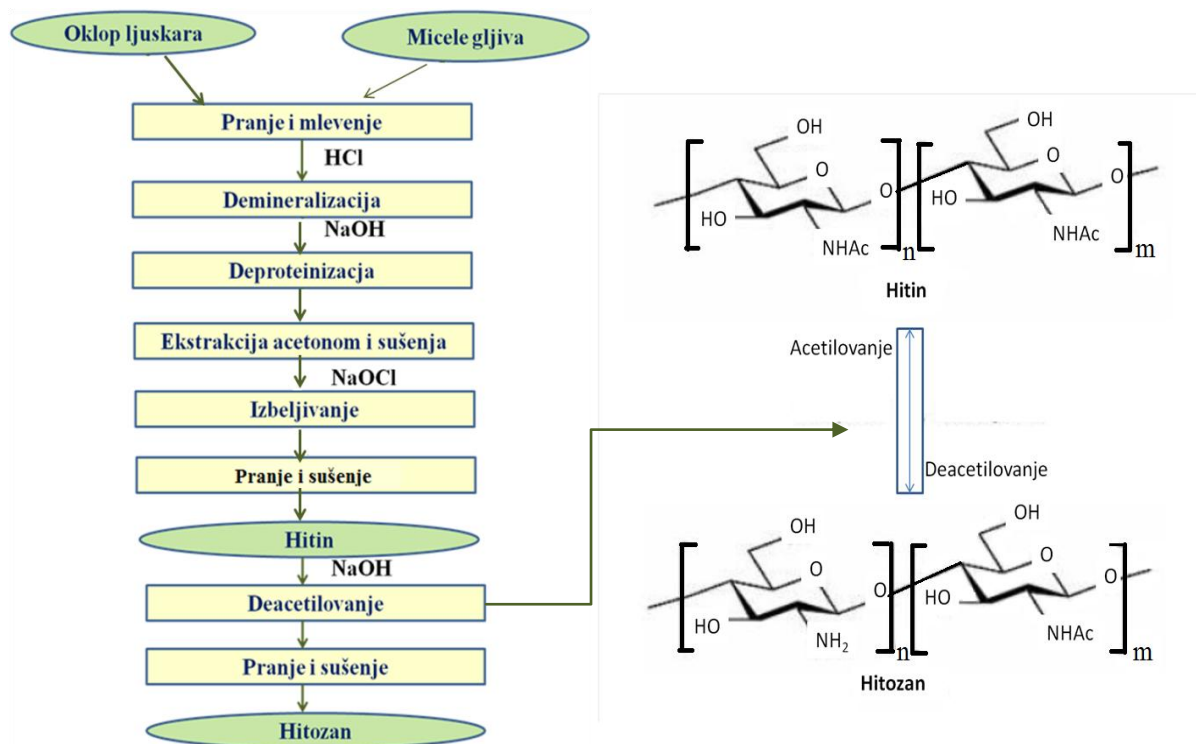
Hitozan je naziv za supstituente hitina niskog stepena acetilovanosti. Primarno se sastoji od glukozamina, 2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukoze, ili (1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoze (Slika 5, Slika 6). Stepent deacetilovanja ("degree of deacetylation-DDA") kod hitina obično se kreće od 5% do 15%, a u hitozanu od 70% do 95%. Visok stepent acetilovanosti ("degree of acetylation DA") i kristalnost molekula hitina čine da on bude nerastvorljiv u uobičajenim komercijalnim rastvaračima.

Deacetilovani hitozan ima slobodne amino grupe, koje se lako naelektrišu pozitivno u kiseloj sredini. To doprinosi rastvorljivosti hitozana u vodenim rastvorima kiselina i omogućava korišćenje hitozana i njegove bioaktivnosti. Ipak, fizičko-hemijske osobine i biološka aktivnost hitozana zavise od procesa proizvodnje. Obzirom da se hitozan proizvodi deacetilovanjem hitina, njegove osobine, kao: čistoća, viskozitet, deacetilovanost, molekulska masa i kristalna struktura mogu znatno da variraju u zavisnosti od procesa proizvodnje. Na primer, izvor hitina može uticati na kristalnost samog hitina, što dalje utiče na bioaktivnost proizvedenog hitozana. Hitin dobijen iz lignji je u  $\beta$ -obliku, koji ima otvoreniju strukturu (molekulski lanci su paralelni), u odnosu na  $\alpha$ -hitin (antiparalelna orijentacija lanaca), koja se sreće kod egzoskeleta ljuskara. Paralelna orijentacija lanaca hitina rezultuje daleko slabijim vodoničnim vezama osnovnih lanaca, izraženijem bubrenju i većoj reaktivnosti pri deacetilovanju (Shahidi et al., 1999).



Slika 5. Hemijska struktura hitina, hitozana i celuloze (Nadarajah, 2005)

Broj i raspored preostalih acetilovanih grupa zavisi od koncentracije baze, temperature i vremena trajanja procesa. Obično se koristi (40 – 50)% NaOH, pri temperaturi od (100 – 160) °C, tokom (0.5 – 5) h, i rezultat je heterogeno N deacetilovanje, sa zonama deacetilovanih monomera. Do reakcije dolazi u amorfnim delovima polimera hitina, pri čemu rezistentni kristalni delovi originalnog molekula hitina ostaju netaknuti. S druge strane, niža koncentracija natrijumhidroksida (~10%) na sobnoj temperaturi, tokom dužeg vremena daće nasumično raspoređene acetil rezidue. Ova metoda se primenjuje na prethodno nabubrelom hitinu u vodenom rastvoru pod vakuumom, kako bi se olakšala difuzija baze u hitinski materijal. Blaži uslovi deacetilovanja se koriste kada je potreban hitozan veće molekulske mase, jer vruć rastvor NaOH može dovesti do kidanja glukozidnih veza (Chi, 2004; Ben i Kurth, 1995). Kod obe metode, primenjuje se velika količina koncentrovane baze i proces traje dugo (1 – 80) h, zavisno od metode). Faktori koji utiču na stepen deacetilovanja su: koncentracija baze, predtretman, veličina čestica i gustina hitina. U praksi, maksimalan stepen deacetilovanosti koji je moguće postići u jednom tretiranju bazom iznosi oko (75 - 85)%. Predložene su različite metode za smanjenje količine upotrebljene baze: deacetilovanje u prisustvu rastvarača mešljivih sa vodom, kao što su 2-propanol, 2-metil-2-propanol, polietilen glikol dimetil etar, aceton ili parafin ulje smanjilo je potrebnu količinu baze za 85%. Upotreba kaskadnog reaktora sa niskom koncentracijom baze, tretman zasićenom parom, upotreba dielektričnog grejanja mikrotalasima su još neke od metoda. Postoje dokazi da se u određenim plesnima i bakterijama odvija enzimatsko deacetilovanje (Gooday *i sar.*, 1991). Deacetilaze su izolovane iz različitih vrsta plesni, *Mucor rouxii*, *Aspergillus nidulans* i *Colletotrichum lindemuthianum*. Aktivnost ovih deacetilaza je ograničena nerastvorljivošću hitina (Martinou *i sar.*, 1998).

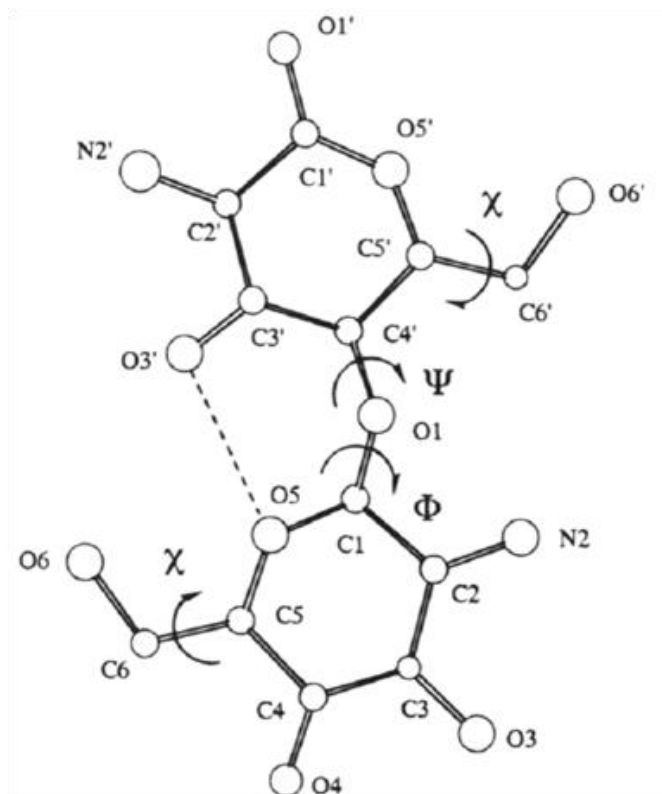


Slika 6: Proces proizvodnje hitina i hitozana (Shahidi *i sar.*, 1999; Chi, 2004)

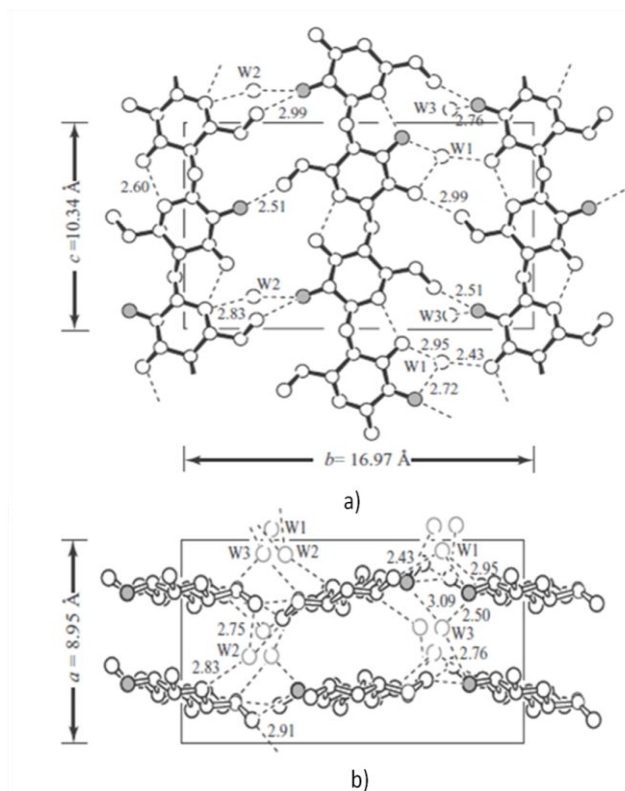
Kao funkcionalni biopolimer, hitozan se aktivno istražuje za različite primene. Funkcionalnost hitozana zavisi od hemijske strukture, kao i od molekulske konformacije i načina pakovanja molekula. U cilju boljeg razumevanja funkcionalnosti, kao i zbog mogućnosti primene i optimizacije funkcionalnih svojstava, neophodno je poznavanje strukture ovog materijala (Okuyana *i sar.*, 2000).

### 2.3.1. Nativna konformacija molekula hitozana

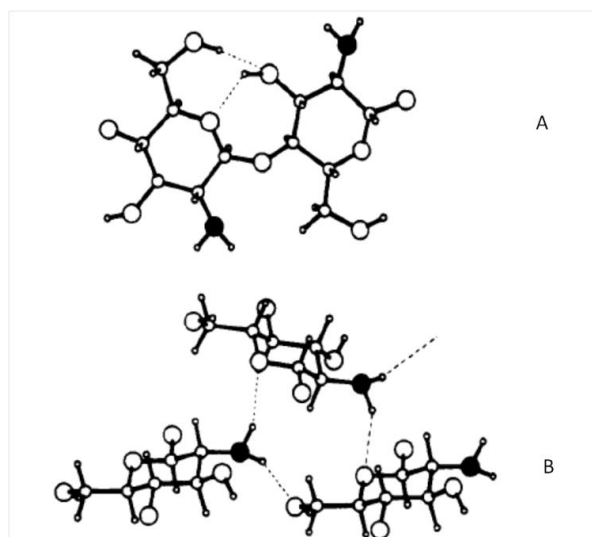
U čvrstom stanju, hitozan karakteriše uređena fibrilarna struktura sa visokim stepenom kristalizacije i polimorfizam. Osnovni parametri koji opisuju konformaciju lanca hitozana prikazani su na *Slici 7*. Rotaciju dve glukozične veze,  $\Phi$  i  $\Psi$  definišu sekvence od četiri atoma: O5-C1-O1-C4' i C1-O1-C4'-C5'. Zajedno sa ovim rotacijama, ugao glikozidnog mosta: C1-O1-C4' može da varira pri podešavanju najstabilnije konformacije molekula. Orijehtacija primarnih hidrosimetil grupa oko C5-C6 veze,  $\chi$  je definisana sekvencom atoma: O5-C5-C6-O6. Najčešća konformacija je jedna od tri stepeničaste konformacije: goš-trans (gt), trans-goš (tg) i goš-goš (gg). Tipične vrednosti ugla  $\chi$  za navedene konformacije su: gt=60°, gg=-60° i tg=180° (Yui *i sar.*, 1994).



Slika 7. Šema označavanja atoma i konformacionih uglova  $\Phi$ ,  $\Psi$  i  $\chi$  (Yui *i sar.*, 1994)



Slika 8. Orijehtacija i konformacija hidratisanog (tetiva) hitozana, prikazana kao projekcija duž a-ose (a) i duž c-ose (b). Puni kružići predstavljaju atome azota. Samo jedna od dve lamele paralelna sa bc ravni je prikazana, zbog jasnoće. Atomi vodonika su izostavljeni, a vodonične veze su prikazane isprekidanom linijom. Sa w su označeni atomi kiseonika molekula vode (Okuyana *i sar.*, 2000)



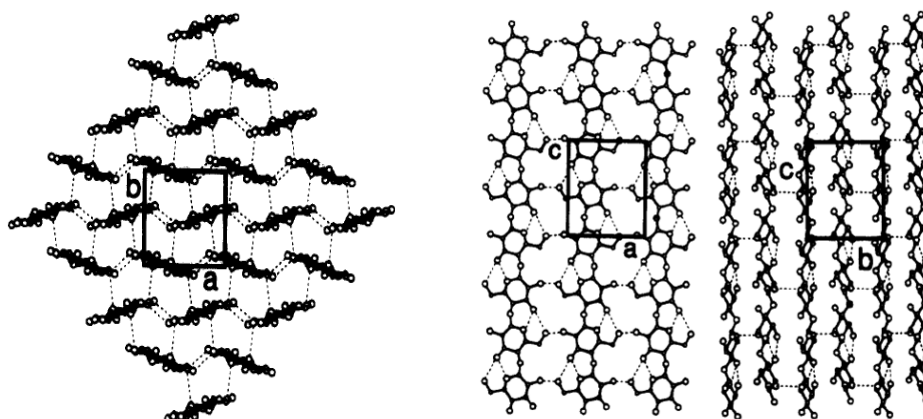
Slika 9. Sistemi intramolekularnog (A) i intermolekularnog (B) povezivanja vodoničnim vezama u strukturi hitozanskog kristala tipa I. Atomi azota su prikazani crnim kružićima (Mazeau *i sar.*, 1994).

Prva šema građe i konformacije molekula hitozana dobijenog iz tetive jastoga postupkom N-deacetilovanja u čvrstoj fazi objavljena je 1936. godine, a objavili su je Clark i Smith, na osnovu rezultata difrakcije X zraka. Kasnije je ovaj model strukture nazvana hitozan iz tetive. Tek 60 godina kasnije, 1997. godine je ova šema bila detaljnije analizirana i

opisana. Lanac hitozana obrazuje izduženi 2/1 heliks, tj. cik-cak strukturu (Slika 8), stabilizovanu intramolekulskim vodoničnim vezama između O-3 i O-5 atoma, kao i nešto slabijim vodoničnim vezama između O-5 i O-6 atoma. Kristalna struktura hitozana se održava mrežom intermolekularnih vodoničnih veza kojima se povezuju N atomi sa O-5 atomima iz prstena susednog antiparalelnog lanca duž c-ose i O-6 atoma susednog lanca duž a-ose (Slika 9). Ovaj izduženi 2/1 heliks je označen kao tip I konformacije hitozana.

Lanci hitozana duž c-ose su pakovani u antiparalelnoj orijentaciji. Duž b ose antiparalelno postavljene lanci hitozana su povezani vodoničnim vezama i čine strukturu lamela koje su naređane duž a-ose. Između ovih lamela prisutni su molekuli vode koji stabilizuju ovu kristalnu strukturu. Polimorfni oblik hitozana iz tetive je hidratizirani kristal. Ovaj polimorfni oblik je najviše zastupljen u uzorcima hitozana. Komercijalno dostupni hitozani imaju ovaj tip kristala, iako se stepen njihove kristalnosti razlikuje.

Kada se hitozan “iz tetive” uroni u vodu i zagreje na oko 200 °C nastaje drugi polimorfni kristalni oblik hitozana, “žareni” kristalni oblik. Ova promena u strukturi je nepovratan proces. Molekularna i kristalna struktura “žarenog” kristala hitozana data je na Slici 10.



**Slika 10. Projekcija kristalne strukture hitozana u dehidriranom (“žarenom”) polimorfnom obliku u ab, ac i bc ravnima. Atomi vodonika su izostavljeni, a vodonične veze su prikazane u obliku isprekidanih linija (Mazeau *i sar.*, 1994).**

U ovoj kristalnoj strukturi nema molekula vode. Razlika u odnosu na hitozan “iz tetive” je u tome što su ovde susedni lanci paralelne orijentacije povezani vodoničnim vezama gradeći lamele, a susedne lamele poređane duž a-ose imaju antiparalelnu orijentaciju. Svaki pojedinačni lanac hitozana ima formu izduženog dvostrukog heliksa, tj. cik-cak strukturu, slično kao kod hitozana “iz tetive”. Cik-cak struktura je i jedina struktura pronađena u kristalima hitozana. Ova struktura je slična strukturi hitina i celuloze (tip I).



### 2.3.2. Konformacije hitozana u njegovim solima

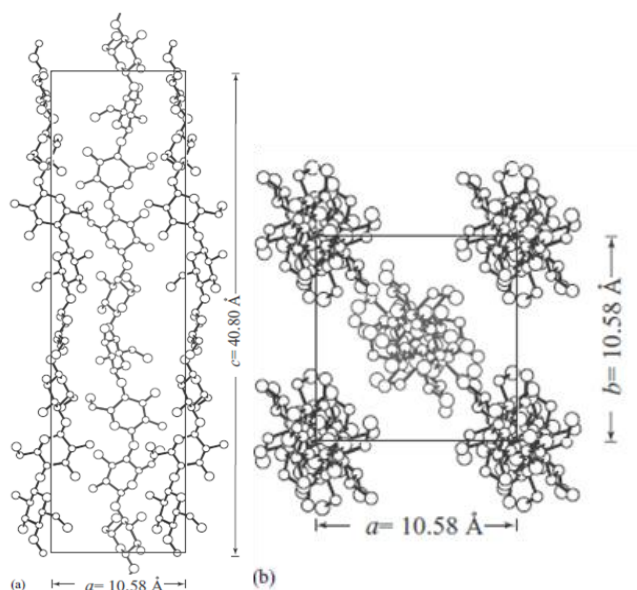
Pored strukturne organizacije izduženog 2/1 heliksa, druge organizacije lanca hitozana pronađene su u solima hitozana i različitih kiselina (Tabela 1). Kako je hitozan polimer D-glukozamina sa slobodnim amino grupama, on je polikatjon koji može da gradi soli sa kiselinama. Analizom strukture kristala soli hitozana u različitim kiselinama, pronađena su četiri osnovna tipa kristala, zavisno, pre svega, od vrste kiseline, ali u nekim slučajevima i od njene koncentracije i temperature pripreme soli (Ogawa *i sar.*, 2004).

Tip I soli je pretežno dehidratisani kristal u kojem lanci hitozana imaju konformaciju 2/1 heliksa, kao kod nativnog hitozana. Konformacione promene su zapažene u solima tipa II i III. Kada je hitozan “iz tetive” uronjen u mešavinu 4M sirćetne kiseline i izopropanala (1:3, v/v), rezultujuća so je imala šemu lanca prikazanu na *Slici 11*. U ovoj šemi, dužina lanca duž c-ose je približno četiri puta veća nego kod neizreagovalog hitozana. Ovo ukazuje na konformacionu izmenu u molekulu hitozana usled formiranja soli. Ove soli su nazvane tip II soli i one imaju hidratizane kristale. Ova konformacija je nestabilnija u odnosu na tip I jer nema intramolekulskih vodoničnih veza, kao kod tipa I. Tokom vremena, soli tipa II spontano prelaze u dehidratisani oblik odavanjem vode i kiseline. Sve ostale soli tipa II pokazale su sličnu šemu lanca kao kod soli sa sirćetnom kiselinom, što indicira da anjoni ovih soli nisu uticali na strukturu kristala, već je na strukturu uticao samo osnovni lanac hitozana (Ogawa i Inukai, 1987; Cairns *i sar.*, 1992, Ogawa *i sar.*, 2004).

**Tabela 1. Konformacije hitozana u njegovim solima**

Tip	Konformacija hitozana	Kiselina
I (dehidratisan)	Izduženi 2/1 heliks	HNO <sub>3</sub> <sup>a</sup> , HBr, HI <sup>b</sup> , HClO <sub>4</sub> <sup>c</sup> , L ili D-mlečna kiselina <sup>b</sup> , maleinska kiselina, L-askorbinska kiselina, D-izoaskorbinska kiselina, salicilna kiselina <sup>d</sup>
II (hidratizisan)	Opušten 2/1 heliks	HNO <sub>3</sub> <sup>e</sup> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, HF, HIO <sub>4</sub> <sup>c</sup> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>c</sup> , L ili D mlečna kiselina <sup>d</sup> , sukcinska kiselina, fumarna kiselina, L-vinska kiselina, monokarboksilne kiseline (mravlja, sirćetna, propionska, buterna)
IIa (hidratizisan)	4/1 heliks	HI <sup>d</sup>
III (dehidratisan)	5/3 heliks	Salicilna kiselina <sup>b</sup> , gentizinska kiselina, aspirin <sup>c</sup>

<sup>a</sup> So je pripremljena u koncentrovanoj kiselini, <sup>b</sup> So je pripremljena na visokoj temperature, <sup>c</sup> 13C NMR u čvrstom stanju, <sup>d</sup> So je pripremljena na niskoj temperature, <sup>e</sup> So je pripremljena u razblaženoj kiselini

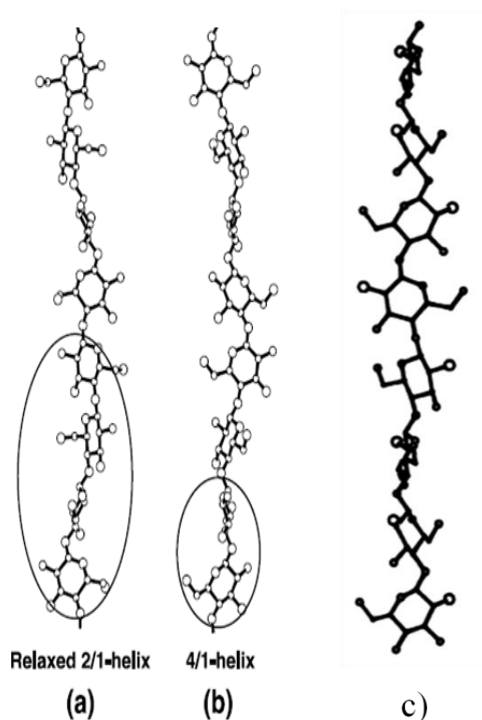


**Slika 11. Pikaz strukture molekula hitozana tipa II, projekcija duž b-ose (a) i duž c-ose (b). Atomi vodonika su izostavljeni (Okuyama *i sar.*, 2000)**

Na *Slici 11.* je prikazana molekularna struktura hitozana u kristalima soli tipa II i ova konformacija hitozana se naziva konformacija tipa II. Lanci su postavljeni antiparalelno, ali za razliku od konformacije u tipu I, molekul ima dužu ponavljajuću jedinicu, a asimetrična jedinica se sastoji od četiri rezidue glukozamina, tj. od tetrasaharida. Kako dva tetrasaharida čine ponavljajuću jedinicu lanca, ovo je takođe 2/1 heliks, ali je konformacija drugačija nego kod tipa I, gde asimetričnu jedinicu čini rezidua glukozamina. Tip II ima oblik koji se naziva opuštenu 2/1 heliks (Okuyama *i sar.*, 2000; Okuyama *i sar.*, 2000<sup>a</sup>). Još jedna podvrsta soli tipa II su soli tipa IIa, koja je identifikovana kod soli hitozana i hidrogen jodida pripremljenih na niskim temperaturama (Lertworasirikul *i sar.*, 2003). Molekularna konformacija je 4/1 heliks sa asimetričnom jedinicom koju čini dimer glukozamina (Slika 12).

Novija konformacija je pronađena u solima hitozana sa medicinskim organskim kiselinama koje imaju fenil grupu, kao: salicilna i gentizinska kiselina (Kawahara *i sar.*, 2003). Ova konformacija molekula podrezumeva 5/3 heliks sa glukozaminom kao asimetričnom jedinicom, levostrani heliks sa pet glukozamidnih rezidua u tri zaokreta heliksa.

Polimorfizam hitozana utiče na njegovu funkcionalnost. U procesu membranske separacije smeše alkohola i vode kroz hitozansku membranu je zapaženo da su molekuli alkohola i vode prodirali u amorfne segmente membrane, dok u kristalne regione ovi molekuli nisu mogli prodrati. Hitozan ne daje soli sa kiselinama, niti komplekse sa jonima tranzicionih metala kada je kristalisan u obliku dehidratisanog “žarenog” kristala. Takođe, hitozan sa velikim procentom kristala u dehidratisanom obliku nije rastvorljiv u uobičajenim rastvaračima za hitozan (može se smatrati hemijski i biološki inertnim), ali hitozan u ovakvom obliku ima visoke vrednosti zatezne jačine (Ogawa, 1991).



**Slika 12. Konformacija lanca hitozana tipa II (a, 2/1 heliks), IIa (b, 4/1 heliks) i III (c, 5/3 heliks) (Lertworasirikul i sar., 2003; Demarger-Andre i Domard, 1994)**

Polimorfni oblik hitozana u filmu će zavisiti od rastvarača, koncentracije hitozana i temperature uklanjanja rastvarača. Sa porastom temperature, sadržaj hidratisanog kristala se smanjuje, dok sadržaj dehidratisanog kristala raste. Tok ove promene zavisi od molekulske mase i stepena N-acetilovanosti hitozana. Bez zagrevanja, stepen kristalizacije je bio izrazito nizak kod hitozana različite molekulske mase i stepena N-acetilovanosti. Sa zagrevanjem do 200 °C, kod hitozana niske molekulske mase i niskog stepena N-acetilovanosti zapažen je veći stepen kristalizacije i brži prelaz iz hidratisanog u nehidratirani kristal (Ogawa, 1991).

Uticaj različitih uslova pripreme hitozanskih membrana na polimorfizam i kristalnost je ispitan pripremom membrana na bazi hitozana različitih molekulskih masa sa 0% N-acetilovanosti, primenom različitih metoda: A) sušenje na vazduhu uz neutralizaciju u rastvoru NaOH, B) neutralizacija NaOH koncentrisanim rastvora pre potpunog sušenja na vazduhu, C) vakuum sušenje na 60 °C, D) membrana osušena na vazduhu je izvučena na suvo pri temperaturi 85 °C pre neutralizacije u NaOH i E) membrana osušena na vazduhu je posle neutralizacije u NaOH izvučena u vodi pri temperaturi 95 °C. Kada su primenjene metode A, C i D detektovani su i hidratirani i dehidratirani kristali hitozana, a stepen kristalizacije je rastao sa smanjenjem molekulske mase. Kod pripreme B nisu pronađeni dehidratirani kristali, dok je sadržaj ovih kristala kod metode E bio najviši, kao posledica visoke temperature.

Filmovi pripremljeni na bazi hitozana u različitim monokarbonskim kiselinama sa i bez neutralizacije filma u NaOH pokazali su stepen kristalizacije oko 35%.

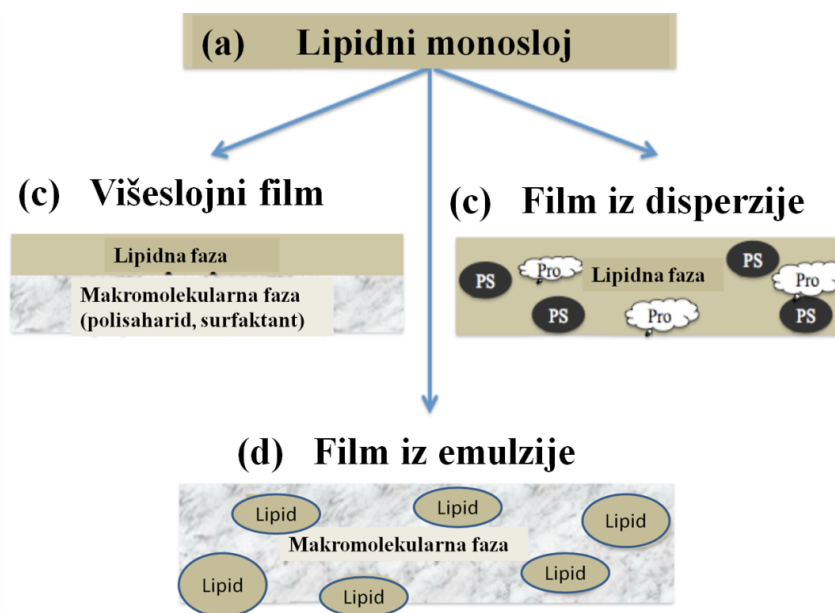
### 2.3.3. Hitozanski biofilmovi

G.W. Rigby je 1936. godine dobio patent za prva istraživanja u izradi filma od hitozana. Ovi filmovi su bili elastični, čvrsti, prozirni, bezbojni, pripremljeni rastvaranjem hitozana. Sledeći hitozanski filmovi, dobijeni sličnom metodom, pojavljuju se tek 1974., Muzarelli, a kasnije se više autora bavilo ovom tematikom: Averbach (1978), Butler *i sar.* (1996), Caner *i sar.* (1998) i Wiles *i sar.* (2000). Filmovi su pokazali dobra barijerna svojstva prema gasovima pri niskoj vlažnosti vazduha i dobra mehanička svojstva, ali su ipak od izveštaja do izveštaja opisane karakteristike varirale, zavisno od izvora hitozana i njegovih karakteristika, upotrebljenog rastvarača i metode za proizvodnju filma, kao i od vrste i količine upotrebljenih plastizera (Nadarajah, 2005).

Od jestivih filmova se očekuje da budu izdržljivi, otporni, fleksibilni, savitljivi i elastični. Očekuje se da pokažu poželjnu otpornost koja će omogućiti da podnesu razne manipulativne procese. Hitozanski filmovi su dobra barijera za gasove. Propustljivost kiseonika je u nivou sa konvencionalnim plastičnim filmovima, kao: polivinilidenhlorid (PVdC) i etilvinil alkohol (EVOH). Opet, zavisno od vrste i načina proizvodnje hitozana variraju i barijerna svojstva filmova. Poboljšanje barijernih svojstava prema vodenoj pari još nije dalo željene rezultate. Pokušalo se sa formiranjem hitozan-lipidnog kompozitnog filma, hitozan-pektinskog laminiranog filma, hitozan-glutaldehidnog filma da bi se smanjila propustljivost vodene pare i rastvorljivost filmova u vodi. Ipak, proizvodnja filma od polisaharida sa adekvatnim barijernim svojstvima za vodenu paru ostaje izazov za istraživače zbog hidrofилne prirode samih biopolimera (van Tuil *i sar.*, 2000).

### 2.4. Kompozitni biofilmovi

Kako svaki od navedenih jestivih filmova nosi svoje prednosti i ograničenja, često se u primeni kombinuju različiti polimeri i/ili lipidi kako bi prednosti jedne komponente neutralisale nedostatke koje eventualno pokazuje druga komponenta. Na ovaj način se često pristupa u rešavanju problema osetljivosti hidrokolooidnih filmova na vlagu, kada se u film na bazi polisaharida ili proteina dodaje lipidna komponenta. Sa druge strane, lipidni film ima nedostatak strukturnog integriteta, koji nadomešćuje uređena struktura hidrokolooidnog filma (Debeaufort and Voilley, 2009). Polisaharidni i proteinski filmovi imaju hidrofилna svojstva, što ih čini osetljivim na dejstvo vodene pare, ali su sa druge strane filmovi koji imaju odlična barijerna svojstva prema gasovima i otpornost na dejstvo ulja. Kada se hidrokolooidnom filmu doda lipidna komponenta, u strukturu se unosi određen udeo nepolarnih grupa koje mogu poboljšati barijerna svojstva filma prema vodenoj pari. Sa druge strane, lipidni materijali imaju loša mehanička svojstva kada se koriste samostalno. Dobra mehanička svojstva hidrokolooidnih filmova mogu kompenzovati ovaj nedostatak lipidnih filmova. Formiranje kompozitnog filma može podrazumevati formiranje višeslojne strukture sloj po sloj ili mešanje hidrofилne i hidrofobne podjedinice uz upotrebu emulgatora ili čvrste suspenzije, kao što je prikazano na *Slici 13*. (Debeaufort and Voilley, 2009).



Slika 13. Struktura kompozitnog filma, PS je polisaharid, a Pro je protein (Lin, 2012)

Na Slici 13. su prikazane varijante formiranja kompozitnog filma. Umesto lipidnog monosloja (Slika 13a), lipidna komponenta može biti umešana u polimernu strukturu upotrebom višeslojnog sistema (Slika 13b), čvrste disperzije (Slika 13c) ili čvrste emulzije (Slika 13d). Višeslojni sistem podrazumeva potpuno razdvojene slojeve komponenata koji se nalaze jedan na drugom. Ovakva struktura može nastati odmah pri formiranju filma nanošenjem jednog po jednog sloja, a može nastati i tokom sušenja filma iz emulzije koja se naruši i dođe do razdvajanja slojeva. Čvrsta emulzija može nastati iz stabilne suspenzije čestica lipida u makromolekulskoj mreži, dok čvrsta disperzija nastaje kada se mala količina polimera inkorporira u kontinualnu lipidnu fazu (Debeaufort and Voilley, 2009). Lipidi koji su vezani u supstratu pokazuju veću kompatibilnost prema proizvodima sa velikim sadržajem masti usled hidrofobne interakcije (Bravin *i sar.*, 2006).

#### 2.4.1. Filmogena emulzija

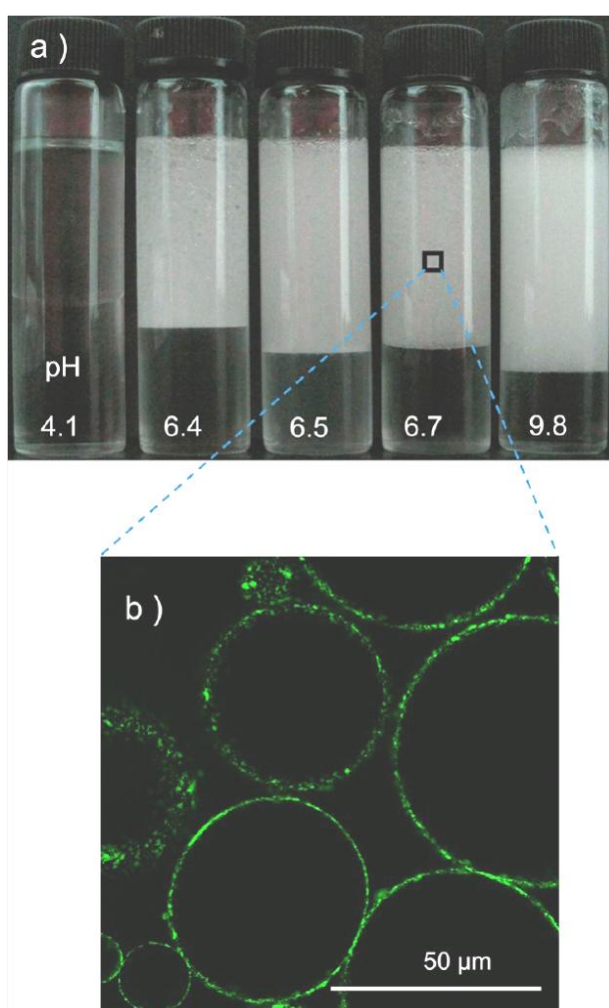
Uslovi formiranja emulzije, struktura nastale emulzije i njena stabilnost direktno utiču na strukturu filma i njegova svojstva. Tokom sušenja filma, rastvarač isparava i efektivna koncentracija lipida raste, a uporedo dolazi do flokulacije, koalescencije i isplivavanja lipida u gornji sloj, zavisno od fizičkog stanja lipida, sastava kontinualne faze i uslova sušenja. Male veličine čestica i visoka stabilnost emulzije tokom sušenja filma će doprineti homogenoj raspodeli lipidnih čestica u filmu, što će doprineti efikasnijoj kontroli transporta vodene pare (Debeaufort *i sar.*, 1993). Stabilnost emulzije zavisi od kompleksnih mehanizama, ali su osnovni faktori prosečna veličina masnih čestica i raspodela veličina ovih čestica, od čega zavisi stabilnost, boja i reološka svojstva filmogene emulzije (Đaković, 2006). Rotor-stator sistemi se često koriste u industriji za homogenizovanje različitih nemešljivih tečnosti visokih viskoziteta (Schubert, 1997), gde je moguće postići veličine dispergovanih čestica oko 1  $\mu\text{m}$  (Urban *i sar.*, 2006). Da bi se postigle niži prečnici lipidnih čestica, potrebno je koristiti homogenizatore koji emulguju pod visokim pritiskom, obično do 500 bar. Ukoliko se koriste

visokopritisni homogenizatori, odnosno mikrofluidizeri, emulzije se mogu formirati i upotrebom pritiska do 1000 bar ili više. Iako upotrebom ovako visokih pritisaka nastaju finije emulzije, prosečna veličina čestice ostaje približno ista, ali raspodela veličine čestica biva uža u odnosu na emulzije formirane upotrebom nižih pritisaka (Perrier-Cornet *i sar.*, 2005; Paquin, 1999, Pinnamaneni *i sar.*, 2003; Strawbridge *i sar.*, 1995). U nekim studijama je istaknuto da ovako intenzivni uslovi emulgovanja, pored toga što doprinose formiranju lipidnih čestica manjeg dijametra i uže raspodele dijametara mogu uticati i na molekule proteina i polisaharida, menjajući njihova funkcionalna svojstva. Pored uticaja na nivo agregacije hidrokoloida, može doći i do nepovratnog narušavanja konformacije biopolimera (Lee *i sar.*, 2009, Kasaii *i sar.*, 2003; Paquin, 1999). Proučavanje uticaja uslova homogenizacije na svojstva filmogene emulzije 0.5% (w/v) rastvora hitozana velikih molekulskih masa i stepena deacetilovanosti 75.6% u 0.25% sirćetnoj kiselini i 0.5% (v/v) oleinske kiseline je pokazalo bimodalnu raspodelu veličina čestica sa dve populacije koje se preklapaju u opsegu (0.1 - 4)  $\mu\text{m}$ . Ova raspodela je značajno izmenjena kada je filmogena emulzija podvrgnuta mikrofluidizaciji pri različitim pritiscima i dobijena je unimodalna raspodela veličine čestica u opsegu (0.03 - 1)  $\mu\text{m}$ . Što je primenjeni pritisak bio viši u rasponu 62 MPa do 163 MPa, dobijene čestice su imale manji srednji dijametar i uži raspon vrednosti dijametara. Filmogena emulzija je imala vrednost pH 4.8 i, pri ovoj vrednosti pH, amino grupe hitozana, koje su pozitivno naelektrisanе (pKa  $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2 \approx 6.5$ ) mogu da reaguju sa negativno naelektrisanim hidroksilnim grupama oleinske kiseline (pKa  $\text{COOH}/\text{COO}^- \approx 4.8$ ), što dovodi do formiranja pozitivno naelektrisanih dispergovanih čestica. Povećanje pritiska pri homogenizaciji dovodi do smanjenja površinskog naelektrisanja čestica, posebno pri pritiscima višim od 83 MPa. Ova pojava je objašnjena kao posledica elektrostatičke interakcije između micela oleinske kiseline i hitozana, što vodi smanjenju površinskog naelektrisanja čestica hitozan-oleinska kiselina (Vargas *i sar.*, 2011). Mikrostruktura filma zavisi od organizacije različitih komponenti u filmogenoj emulziji i od interakcije ovih komponenti tokom sušenja filma. Mikrostruktura hitozanskog filma je bila izmenjena dodatkom oleinske kiseline. Došlo je do pojave diskontinuiteta hitozanskog matriksa zbog čestica lipida smeštenih u polimerni matriks. Primenom mikrofluidizacije nižih pritisaka, došlo je do smanjenja razlika između dve faze, čestice lipida su bile manje i bolje povezane za polimerni nosač. Primenom viših pritiska javile su se nepravilnosti u strukturi usled agregacije lipidnih čestica, što je najverovatnije posledica narušenog međupovršinskog omotača usled čega dolazi do flokulacije formiranjem mostova. Pri istim uslovima homogenizacije, dodatak oleinske kiseline je doveo do sniženja propustljivosti filmova za vodenu paru. Dodatno sniženje propustljivosti je postignuto mikrofluidizacijom, osim upotrebe najviših pritisaka, kao što je zapaženo u mikrostrukturi filmova (Vargas *i sar.*, 2011).

Na bazi svojstava molekula hitozana, moguće je formirati povratnu Pikingovu emulziju (Liu *i sar.*, 2012). Pri niskim vrednostima pH, hitozan je rastvorljiv u vodi i slojevi ulja i vodenog rastvora hitozana su nemešljivi (Slika 14). Povišenjem vrednosti pH rastvora, hitozan postaje nerastvorljiv u vodi i formira se disperzija čestica hitozana koje se adsorbuju na graničnoj fazi ulje/voda i dolazi do formiranja emulzije ulja u vodi. Sniženjem pH vodene faze ove emulzije do pH 4, dolazi do deemulgovanja. Upotrebom hitozana umesto surfaktanta uspešno je formirana Pikingova emulzija kojim se može manipulirati izmenom vrednosti

pH vodene faze. Emulziju je bilo moguće formirati pri  $\text{pH} > 6$ , ali je u opsegu  $6 < \text{pH} < 6.5$  emulzija bila stabilna oko 2 dana, dok je za  $\text{pH} > 6.5$ , formirana emulzija bila stabilna oko 2 meseca. U ovom slučaju, hitozan ne stabilizuje emulziju smanjenjem površinskog napona rastvora (kao klasičan surfaktant), već adsorbicijom nanočestica na graničnoj površini ulje/voda (slično kao koloidne čestice  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  i silike) (Tan *i sar.*, 2011; Vignati i Piazza, 2003).

Za hitozan je određena HLB vrednost od 36.7. Ovo je HLB vrednost koja odgovara jonskom surfaktantu izrazito hidrofilnog karaktera. Ipak, na osnovu strukture hitozana, očekivana je viša HLB vrednost, što može biti posledica niskog stepena jonizacije. Hitozan, zbog svoje strukture nije efikasan u sniženju površinskog napona na granici faza vazduh-rastvor, ali se može adsorbovati na granici faza ulje/voda i na ovaj način mehanički i elektrostatički stabilizovati dispergovanu fazu emulzije.



**Slika 14 (a) Digitalna fotografija emulzije tečnog parafina u vodenom rastvoru hitozana, pri različitim vrednostima pH, (b) Fluorescentni mikrograf emulzije stabilizovane hitozanskim nanočesticama, pri pH 6.7. Koncentracija hitozana je 0.1 %mas. Odnos uljane i vodene faze je 1:1 (Liu *i sar.*, 2012)**

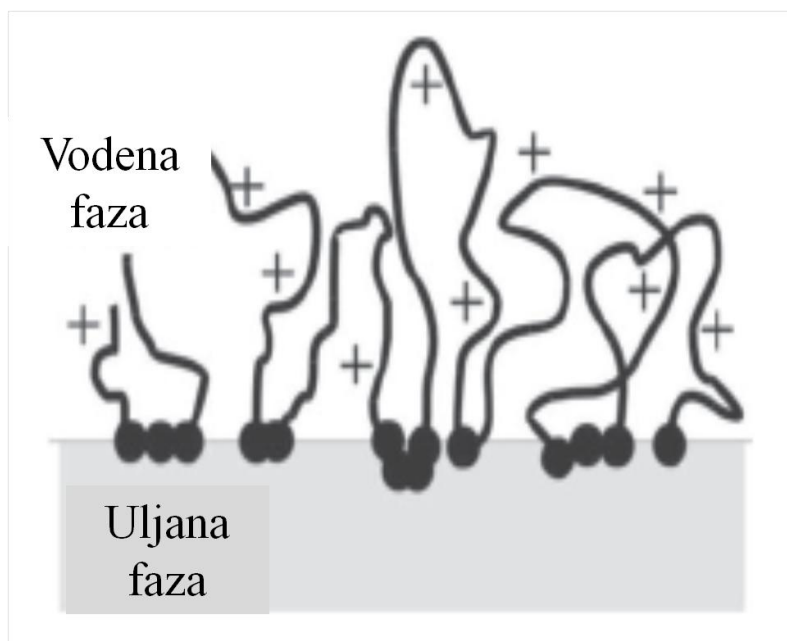
Dvostruka emulzija voda/ulje/voda ulja suncokreta u vodi je formirana u prisustvu 1% (w/v) hitozana, bez upotrebe surfaktanta. Zahvaljujući visokoj vrednosti HLB, hitozan može da potpomogne formiranje emulzije tipa ulje u vodi. Uzevši u obzir da hitozan nije čista

supstanca, već smeša molekula različitog stepena deacetilovanosti, on se verovatno ponaša kao smeša emulgatora različitih vrednosti HLB. Obzirom da je udeo molekula visokog stepena deacetilovanosti visok, kontinualna faza nastale emulzije je voda. Optimalni odnos hitozan:ulje, koji je obezbedio stabilnu emulziju u toku dva meseca i iz koje se hitozan više nije mogao izdvojiti rastvaranjem sirćetnom kiselinom, bio je 0.2 g hitozana/g ulja. Adsorbovani hitozan se najverovatnije ponaša kao interfazni barijerni sloj koji otežava difuziju kako hidrofилnih, tako i hidrofobnih supstanci kroz čestice emulzije. Povišenjem vrednosti pH kontinualne faze, hitozan je ostao adsorbovan na graničnoj površini faza stabilizujući emulziju. Veličina čestice dispergovane faze je zavisila od odnosa hitozana i ulja u emulziji (Schulz *i sar.*, 1998). Ispitivanjem uticaja stepena deacetilovanosti molekula hitozana na emulgujuća svojstva u emulziji ulja suncokreta u vodi, ustanovljeno je da je, u opsegu (73 – 95)%, najefikasniji hitozan stepena deacetilovanosti (80 – 89)%, sa dva optimuma pri 81% i 88%. Pri stepenu deacetilovanosti od 81% formirana je stabilna emulzija visokog viskoziteta, dok je uz hitozan stepena deacetilovanosti 88% formirana stabilna emulzija niskog viskoziteta (Del Blanco *i sar.*, 1999). Viskozitet, stabilnost i starenje emulzije voda/ulje/voda suncokretovog ulja u vodi bili su proporcionalni dodatnoj količini hitozana. Pri koncentraciji hitozana od 0.2% (w/v), razdvajanje slojeva emulzije započelo je nakon (4 - 6) h, dok je za više koncentracije (1%, w/v i 2%, w/v) emulzija bila stabilnija.

Iako je korišćen za formiranje emulzije suncokretovog ulja u vodi, sam hitozan se ne može smatrati efikasnim emulgatorom zbog niske površinske aktivnosti, koja je u skladu sa hemijskom strukturom hitozana (polisaharid sa katjonskim  $-\text{NH}_3^+$  i  $-\text{OH}$  grupama raspoređenim duž ugljovodoničnog lanca). Ulje suncokreta sadrži visoku koncentraciju oleinske kiseline, koja je dobar emulgator. Takođe, između hitozana i oleinske kiseline može doći do formiranja kompleksa elektrostatičkom interakcijom između  $-\text{COO}^-$  i  $-\text{NH}_3^+$  grupa, što bi dovelo do stabilizacije formirane emulzije (Liu *i sar.*, 2012).

Kada je analizirana mogućnost formiranja emulzije tečnog parafina u vodenom rastvoru hitozana, potvrđeno je da je površinska aktivnost hitozana niska. Hitozan potpomaže formiranje emulzije ulje u vodi povećanjem viskoziteta disperzne faze i formiranjem guste polielektrolitske četke na površini kapi ulja (Slika 15). Tek pri višim koncentracijama hitozana je bilo moguće formirati stabilnu emulziju (preko 0.20%, w/v), jer je pri nižim koncentracijama broj makromolekula nedovoljan da dođe do formiranja polielektrolitske "četke" na površini kapi ulja, a viskozitet disperzne faze nedovoljan da dovede do stabilizacije emulzije. Brzina razdvajanja slojeva emulzije, kao i visina izdvojenog sloja direktno zavise od koncentracije hitozana (Payet i Terentjev, 2008).





**Slika 15. Prikaz organizacije čestica hitozana na graničnoj površini ulje/voda sa malim hidrofobnim vezivnim mestima (crne tačke) na strani ulja i gustom četkom dugačkih hidrofилnih lanaca na strani vode (Payet i Terentjev, 2008)**

Ispitan je uticaj molekulske mase (15 kDa, 145 kDa i 200 kDa) i gustine naelektrisanja (stepen deacetilovanosti 40%, 77% i 92%) molekula hitozana na karakteristike emulzije kukuruznog ulja u vodi koja je stabilizovana slojem PAM i polielektrolita. Zaštita emulgovanih kapi višeslojnim omotačem može dovesti do formiranja stabilnije emulzije, u odnosu na emulziju stabilizovanu jednim slojem emulgatora. Prvo je formirana emulzija ulja u vodi stabilizovana PAM (natrijum dodecil sulfat ili polietilen glikol sorbitan monolaurat, Tween 20), a zatim je u ovu emulziju dodat rastvor hitozana, tako da je koncentracija ulja bila 3% (w/v), a koncentracija hitozana se kretala od (0 – 1)% (w/v). Kada je koncentracija hitozana bila ispod koncentracije koja je potrebna da bi se zasitila površina kapi disperzne faze, došlo je do izražene agregacije kapi usled formiranja mostova koji povezuju čestice u emulziji, dok je pri višim koncentracijama hitozana bilo moguće formirati stabilnu emulziju. Nije uočena značajna zavisnost  $\zeta$  potencijala i srednjeg prečnika čestica emulzije od molekulske mase hitozana, ali je u prisustvu hitozana sa najnižim stepenom deacetilovanosti od 40% formirana emulzija sa najnižim srednjim prečnikom i  $\zeta$  potencijalom dispergovanih čestica. Stabilnu višeslojnu emulziju je moguće formirati mešanjem rastvora hitozana srednje ili visoke molekulske mase sa jonskom i nejonskom PAM (natrijum dodecil sulfat ili polietilen glikol sorbitan monolaurat, Tween 20) (Mun *i sar.*, 2006).

## 2.5. Postupci dobijanja biofilmova

U prehrambenoj industriji se jestivi filmovi mogu primeniti u zaštiti proizvoda na više različitih načina. Može se formirati jestiva prevlaka ili premaz na površini proizvoda ili se formira film koji se koristi za umotavanje ili pakovanje proizvoda.

**Tabela 2. Primeri komercijalnih premaza u prehrambenoj industriji (Lin, 2012)**

Komercijalni naziv	Osnovna komponenta	Primena
“Freshseel”	estri saharoze	Produženje roka održivosti lubenice
“Fry Shield”	Ca pektinat	Smanjuje upijanje masnoće tokom prženja ribe i povrća
“Nature Seal”	Ca askorbat	Jabuke, avocado, šargarepa i drugo povrće
“Nutrasave”	N,O-karboksimetil-hitozan	Smanjuje gubitak vlage iz avokada, održava čvrstoću
“Opta Glaze”	pšenični gluten	Premaz visokog sjaja za upotrebu kao glazura na pekarskim proizvodima umesto glazure od sirovog jaja, sprečava mikrobiološki kvar i pruža ograničenu zaštitu od gubitka vlage
“Semperfresh”	estri saharoze	Sprečava gubitak vlage višanja i krušaka i čuva prirodnu boju voća
“Z* coat”	kukuruzni zein	Produžava rok održivosti orašastih plodova

Najčešće korišćen pristup je **formiranje jestive prevlake ili premaza na površini proizvoda**. Tehnike u nanošenja jestivih prevlaka se moraju prilagoditi samim karakteristikama materijala i proizvoda. Najčešće se formiraju vodeni rastvori, koloidne disperzije ili emulzije čija se primena može postići: ručnim premazivanjem pomoću četke, prskanjem (sprej) tehnikom, potapanjem u filmogeni rastvor i ceđenjem, raspodelom u posudi koja rotira, prevlačenjem u fluidizovanom sloju ili vazдушnim četkanjem. Uopšteno se preporučuje korišćenje relativno visokih koncentracija filmogenih rastvora, disperzija i emulzija da bi se na površini proizvoda formirao kontinualni premaz veće debljine. U nekim slučajevima (npr. kod kalcijum-alginata) potrebno je sprovesti i drugu fazu obrade, kroz rastvor za umrežavanje. Stabilizacija premaza se postiže sušenjem ili hlađenjem zavisno od vrste materijala. Iako se sa industrijskog gledišta želi postići što brža proizvodnja premaza ili filma, od velike je važnost izvesti dobru regulaciju temperature hlađenja ili uslova sušenja, tako da se dobijeni premaz ili film kompaktno formira. Ukoliko se stabilizacija sprovede prebrzo, dolazi do nejednakog pucanja premaza, koji poprima rupičasti izgled. U većini slučajeva, za izradu dobrog filma, od presudnog je značaja veština, iskustvo i dobra procena radnika u pogonu (Galić, 2010). Primeri komercijalnih jestivih biofilmova u prehrambenoj industriji su dati u *Tabeli 2*.

Kada se formira film nezavisno od proizvoda, u primeni su suvi i vlažni postupak. Oba postupka započinju rastvaranjem sastojaka u adekvatnom rastvaraču, a završavaju se uklanjanjem tečne faze sušenjem (Peressini *i sar.*, 2003). U suvom postupku, kao što je ekstruzija, materijal se meša sa manjom količinom tečnosti i temperatura materijala u ekstruderu se povećava iznad temperature prelaza u staklasto stanje. U ovoj tački materijal se

transformiše iz čvrste faze u rastop uz povećanje mobilnosti. Materijal se zatim ispušta kroz mlaznicu i seče u određene oblike (Peressini *i sar.*, 2003). Suvi postupak se uglavnom koristi za proizvodnju filmova na polu-komercijalnom i komercijalnom nivou. Vlažni postupci, kao što su: razlivanje u kalupe, razlivanje u konstantnoj debljini i direktno presovanje su postupci koji se koriste u laboratorijskoj proizvodnji filmova (Lin, 2012).

**Formiranje filmova na laboratorijskom nivou** najčešće podrazumeva upotrebu **metode razlivanja**. Zbog velikog sadržaja vode u filmogenim rastvorima, teško je primeniti klasične postupke za proizvodnju plastičnih ambalažnih materijala (Peressini *i sar.*, 2003). Pri sintezi biofilmova, često se za modifikaciju i poboljšanje svojstava filmova koriste plastifikatori i emulgatori (Hernandez-Izquierdo i Krochta, 2008). Najčešće se za nanošenje biofilmova koriste podesivi aplikatori za formiranje filma uniformne debljine. Filmogeni rastvor se, u definisanoj masi, razliva na podlogu u uniformnoj debljini, nakon čega se film suši pri ambijentalnim uslovima ili primenjujući ubrzano sušenje (viša temperatura, vakuum sušenje) (Du *i sar.*, 2008; Yoo i Krochta, 2011). Rastvor polimera formira film kroz veći broj faza. Kada se rastvor polimera nanese na neku površinu, zahvaljujući kohezionim silama, formiraju se veze između molekula polimera. Kada su kohezione sile između molekula relativno jake, formira se naležuća kontinualna površina polimernog materijala. Srastanje naležućeg sloja polimera se dešava zbog difuzije. Tokom isparavanja rastvarača napreduje proces geliranja i omogućava polimernim lancima da se poređaju dovoljno blizu jedan drugog da bi formirali sledeći polimerni sloj. Kada postoji adekvatna kohezijska atrakcija između molekula, dovoljna difuzija i potpuno isparenje rastvarača, polimerni lanci će se ređati tako da oforme film (Nadarajah, 2005). Nakon sušenja, filmovi se skidaju sa podloge, kondicioniraju i testiraju ili upotrebljavaju u željenoj formi (Rossman, 2009; Lin, 2012).

**Dirktno presovanje** je postupak koji podrazumeva nalivanje tečne smese u kalupe, nakon čega se primenjuje povišeni pritisak i temperatura da se ispari rastvarač, a osušena masa dobija oblik kalupa (Hernandez-Izquierdo i Krochta, 2008). Ova metoda je primenjiva za jestive filmove na bazi proteina i polisaharida, zahvaljujući specifičnim termičkim osobinama. Cunngham *i sar.* (2000) su razvili postupak za dobijanje filma na bazi proteinskog izolata soje plastifikovanog glicerolom, primenjujući uslove: 150°C, 10 MPa, tokom 2 minuta. U odnosu na klasični metod razlivanja, ovaj postupak proizvodnje filmova u laboratoriji je značajno brži (Hernandez-Izquierdo i Krochta, 2008). Silika, Teflon, PA, PP i PE su korišćeni kao materijali za kalupe, u zavisnosti od polarnosti filmogene smeše (Hernandez-Izquierdo i Krochta, 2008; Stepto, 2003; Lin, 2012).

**Za proizvodnju filmova na komercijalnom nivou** koriste se metode kontinualnog razlivanja i ekstruzija.

**Metoda kontinualnog razlivanja** podrazumeva uniformno razlivanje filmogene smeše na kontinualnu čeličnu traku ili drugu dizajniranu podršku. Razlivena smeša prolazi kroz komoru za sušenje da bi se uklonio rastvarač. Suv film se skida sa nosača i mota u rolne za kasniju obradu. Ovaj metod se može koristiti i za višeslojno razlivanje. Nakon što prvi sloj suvog filma napusti komoru za sušenje može se naneti tanak, sekundarni omotač. Dalje, krajnji proizvod se može posuti puderom da bi se izbeglo lepljenje u rolni ili se može štampati

primenom jestivih boja. Dužina komercijalnih konvejera je najčešće (15 - 30) m, a širina (0.5 - 1.5) m (Rossman, 2009; Lin, 2012).

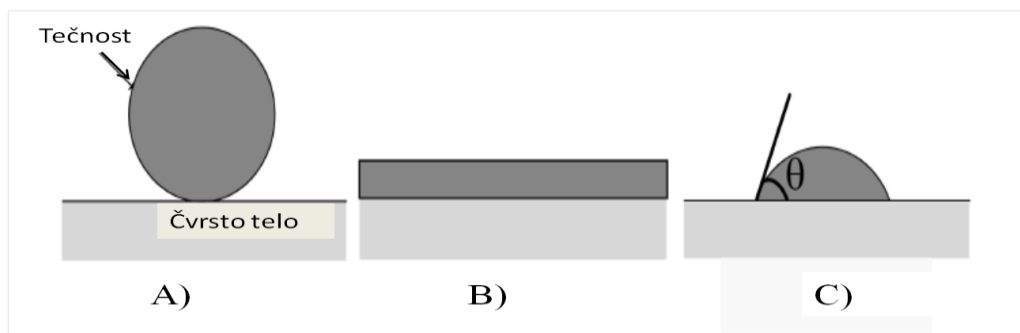
**Ekstruzija** je druga metoda koja se koristi za proizvodnju filmova na komercijalnom nivou. Ekstruzija se može podeliti u tri dela: punjenje, mešanje i grejanje. Mešavina sastojaka filma prvo ulazi u zonu punjenja gde se komprimuje vazduhom. Ovaj sistem najbolje radi uz minimalnu upotrebu vode ili rastvarača, ali je upotreba plastifikatora potrebna (Peressini *i sar.*, 2003). Kako se sastojci prebacuju u zonu mešanja, rastu pritisak i temperatura, kao i gustina mešavine. Mešavina zatim dospeva u zonu grejanja, gde se primenjuje maksimalni pritisak, temperatura i napon smicanja. Puž ekstrudera gura otopljeni polimer kroz mlaznicu nakon čega se on trenutno hladi (Hernandez-Izquierdo i Krochta, 2008). Nedostaci ove metode su da ona može koristiti samo za materijale koji su rezistentni na uticaj toplote i koji imaju mali sadržaj vlage (Lin, 2012).

## 2.6. Karakterizacija biofilmova

Da bi se omogućila uspešna primena i predvidelo ponašanje biofilmova tokom pakovanja, distribucije i skladištenja, a i u postupku dizajniranja biofilma za određenu namenu, potrebno je izvršiti karakterizaciju ovih materijala. Osnovna karakterizacija materijala podrazumeva određivanje mehaničkih, strukturnih, fizičko-hemijskih, barijernih i bioloških svojstava.

### 2.6.1. Mehanička svojstva biofilmova

*Debljina* biorazgradivih filmova je važna karakteristika koja direktno utiče na ostale osobine filma (mehaničke, barijerne), na potencijalnu primenu filma i održivost upakovanog proizvoda. Efektivnost biorazgradivog filma u zaštiti upakovanog proizvoda primarno zavisi od kontrole rasipanja upakovanog proizvoda, što je direktna posledica debljine filma i ujednačenosti debljine filma (Skurtys *i sar.*, 2010). Debljina filma ne sme prelaziti minimalnu i maksimalnu kritičnu vrednost, kako film ne bi drastično redukovao unutrašnju koncentraciju kiseonika ili povećao koncentraciju CO<sub>2</sub>, kod anaerobne fermentacije upakovanog proizvoda. Kod primene jestivog omotača, efikasnost u zaštiti proizvoda direktno zavisi od kvaliteta nanošenja filmogenog rastvora, debljine i ujednačenosti debljine premaza. Kada se kap tečnosti nanese na čvrstu površinu može doći do potpunog ili delimičnog kvašenja čvrste površine (Slika 16). Veće kvašenje će dovesti do formiranja premaza manje debljine.



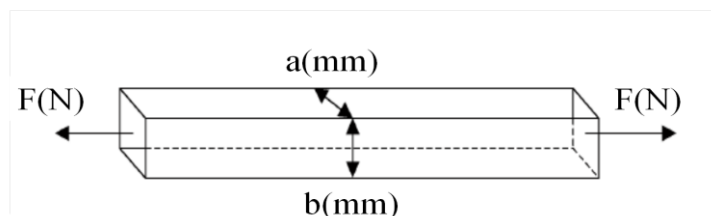
Slika 16. Kap tečnosti na ravnoj čvrstoj površini. A) nema kvašenja  $\theta=180^\circ$ , B) potpuno kvašenje  $\theta=0^\circ$ , C) delimično kvašenje ( $0 < \theta < 180^\circ$ ) (Skurtys *i sar.*, 2010)

Debljina premaza zavisi od fizičkih osobina filmogenog rastvora, kao što su gustina, viskozitet i površinski napon, ali i od metode koja je primenjena za nanošenje premaza: uranjanje, nanošenje sprejem, četkicom, glaziranje. Metode za određivanje debljine se mogu klasifikovati u dve grupe: kontaktne i nekontaktne metode. Među kontaktnim metodama, najčešće se koristi metoda merenja debljine mikrometrom. Najčešće je debljina filma manja od 0.25 mm. Nekonтактne metode su: optička i elektronskenirajuća mikroskopija, konfokalna Raman mikrospektrometrija, Furije transformišuća Raman spektrometrija i površinski poboljšano Raman rasejanje (Skurtys *i sar.*, 2010).

Mehanička svojstva polimernog materijala se mogu opisati određenim parametrima koji govore o jačini i deformaciji materijala. Ove karakteristike mogu naučnicima, tehnologima, dizajnerima materijala ukazati na potencijalne performanse materijala. Zatezne karakteristike napon-deformacija se određuju merenjem sile potrebne za izvlačenje materijala i promena kroz koje materijal prolazi primenom ove sile, pri konstantnoj brzini deformacije. Napon se izračunava prema *Formuli 1*:

$$\text{Napon (MPa)} = \text{Sila (N)} / \text{Površina preseka (mm}^2\text{)} \quad (1)$$

U slučaju prikazanom na *Slici 17.*, površina na koju deluje sila je  $a \cdot b$  (mm<sup>2</sup>). Ipak treba imati u vidu da je ovo površina na koju deluje sila pre početka testa, ali se tokom trajanja testa ova površina smanjuje, a napon biva sve veći. Ipak, ovakva definicija je prihvaćena u praksi.

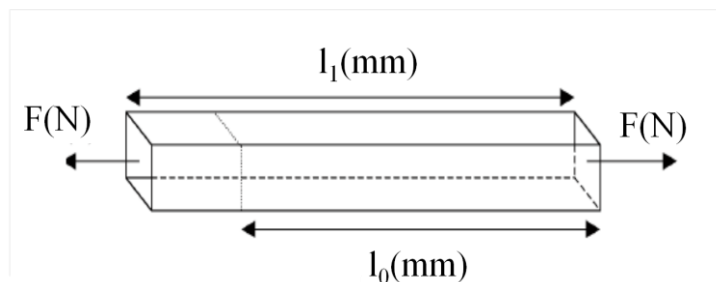


Slika 17. Napon zatezanja u epruveti materijala (Brown, 2002)

Deformacija se izračunava kao:

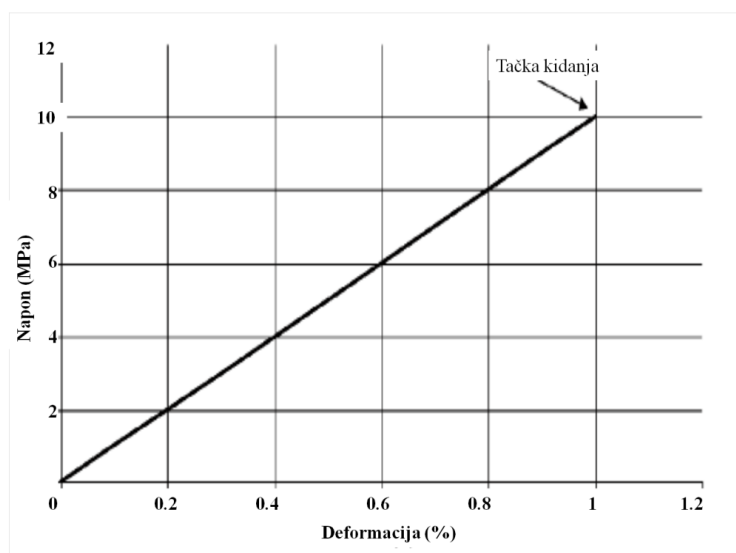
$$\text{Deformacija} = \text{Izduženje } \delta l \text{ (mm)} / \text{Početna dužina } l_0 \text{ (mm)} \quad (2)$$

Kao što je prikazano na *Slici 18.*,  $\delta l$  je u svakom trenutku jednako  $l_1 - l_0$ . Najčešće se deformacija izražava u procentima (množenjem vrednosti sa 100).



**Slika 18. Deformacija zatezanja u epruveti materijala (Brown, 2002)**

Imajući u vidu zatezna svojstva napon-deformacija savršeno elastičnog materijala koja su prikazana na *Slici 19.*, može se uočiti da je zavisnost napona i deformacije linearan sve do momenta kidanja materijala.



**Slika 19. Grafik napon-deformacija kod idealno elastičnog materijala (Brown, 2002)**

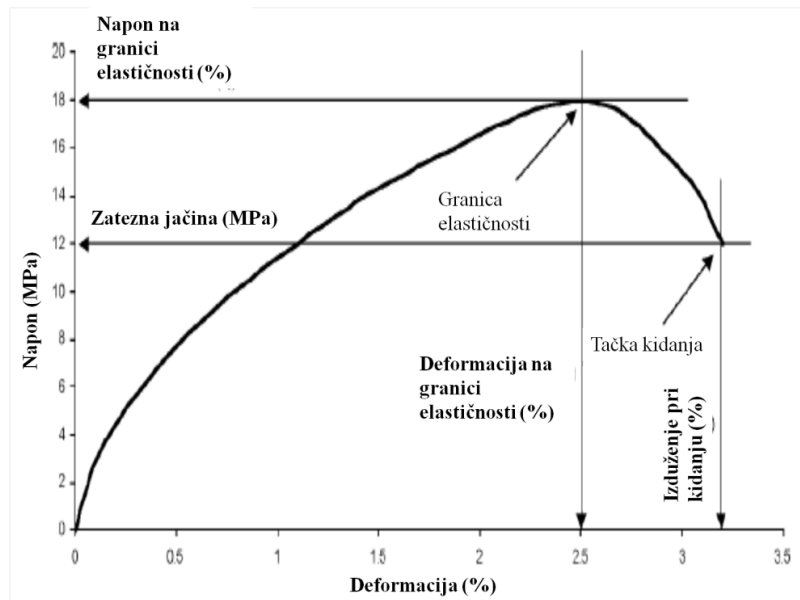
U ovom slučaju je odnos napona (MPa) i deformacije (%) konstantan i ovaj odnos predstavlja elastični moduo materijala (GPa). Međutim, realni elastični polimerni materijali nemaju linearan odnos napona i deformacije (ovakva zavisnost se sreće samo kod krutih materijala), već postoje različiti modeli, a četiri osnovna su:

a) materijali kod kojih je napon na granici elastičnosti veći od napona kidanja, odnosno zatezne jačine materijala imaju zavisnost napon-deformacija prikazan na *Slici 20.* Granica elastičnosti je tačka nakon koje sa daljim povećanjem vrednosti deformacije nema porasta vrednosti napona. Granica elastičnosti je definisana vrednostima napona i deformacije na granici elastičnosti, a tačka pucanja materijala je definisana zateznom jačinom i izduženjem pri kidanju. Kod ovih materijala su zatezna jačina i izduženje pri kidanju manji od napona i deformacije na granici elastičnosti materijala.

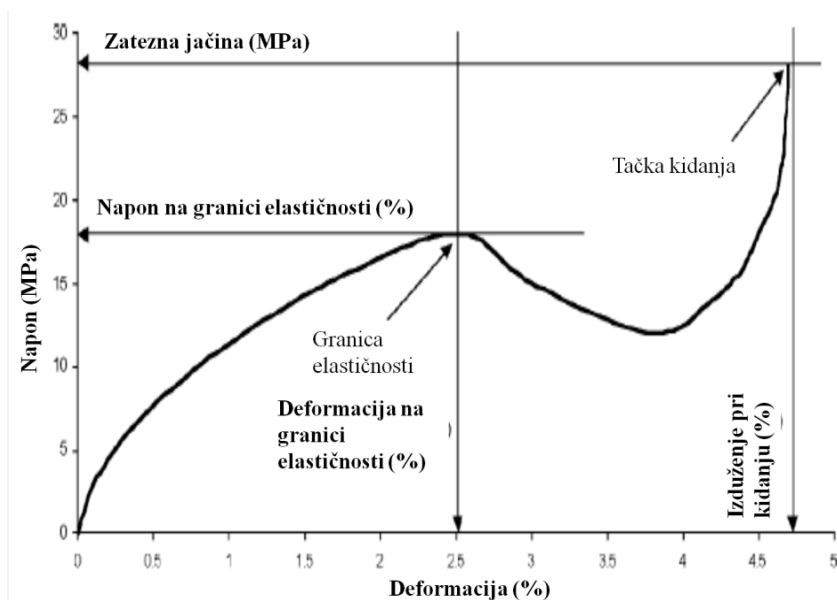
b) materijali kod kojih je napon na granici elastičnosti manji od napona kidanja, odnosno zatezne jačine materijala imaju zavisnost napon-deformacija prikazan na *Slici 21*.

c) materijali kod kojih je napon na granici elastičnosti jednak naponu kidanja, odnosno zateznoj jačini materijala imaju zavisnost napon-deformacija prikazan na *Slici 22*.

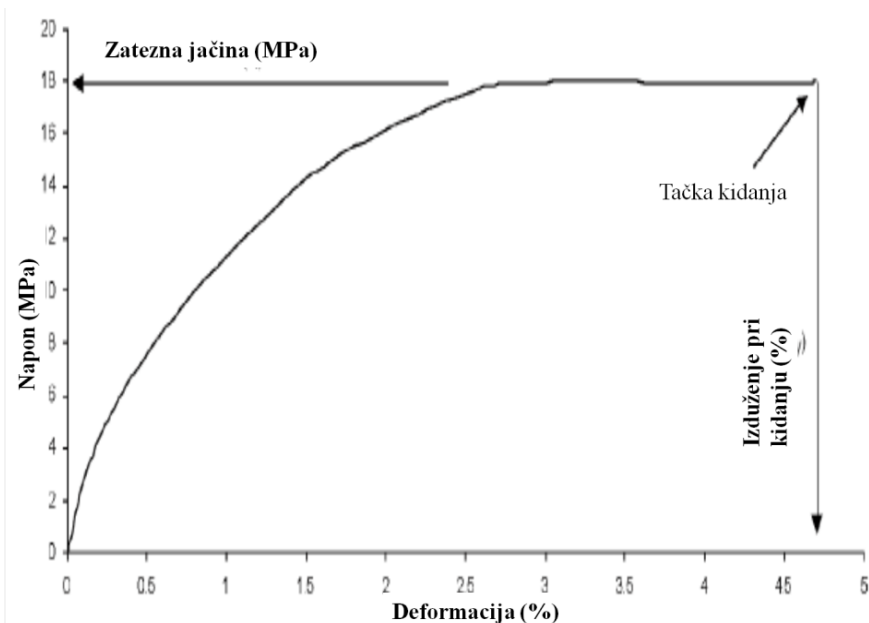
d) kruti materijali kod kojih je zavisnost napon-deformacija približno linearna (*Slika 23*)



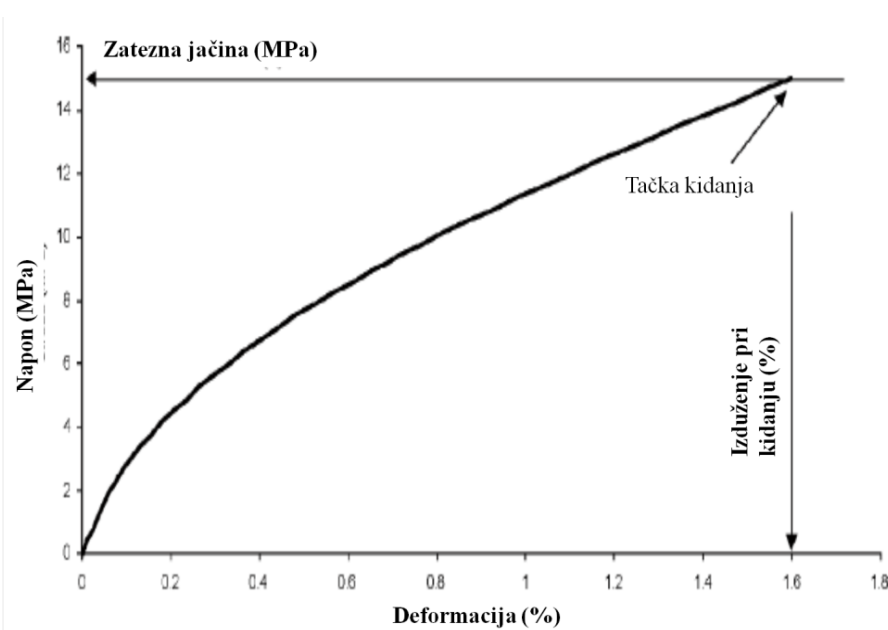
Slika 20. Grafik napon-deformacija kod materijala sa većim naponom na granici elastičnosti u odnosu na napon kidanja materijala (Brown, 2002)



Slika 21. Grafik napon-deformacija kod materijala sa manjim naponom na granici elastičnosti u odnosu na napon kidanja (zateznu jačinu) materijala (Brown, 2002)



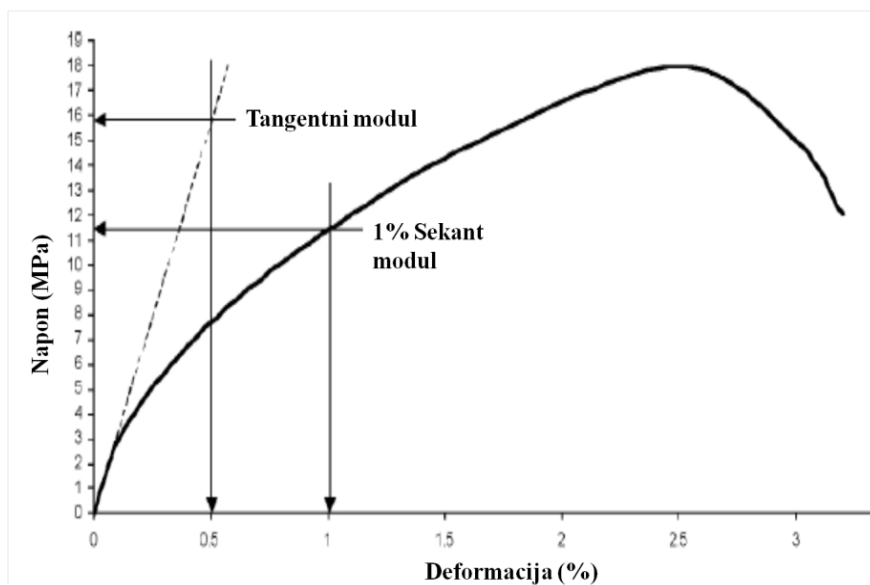
Slika 22. Grafik napon-deformacija kod materijala kod kojih su napon na granici elastičnosti i napon kidanja (zateznu jačinu) materijala jednaki (Brown, 2002)



Slika 23 Grafik napon-deformacija kod krutih materijala (Brown, 2002)

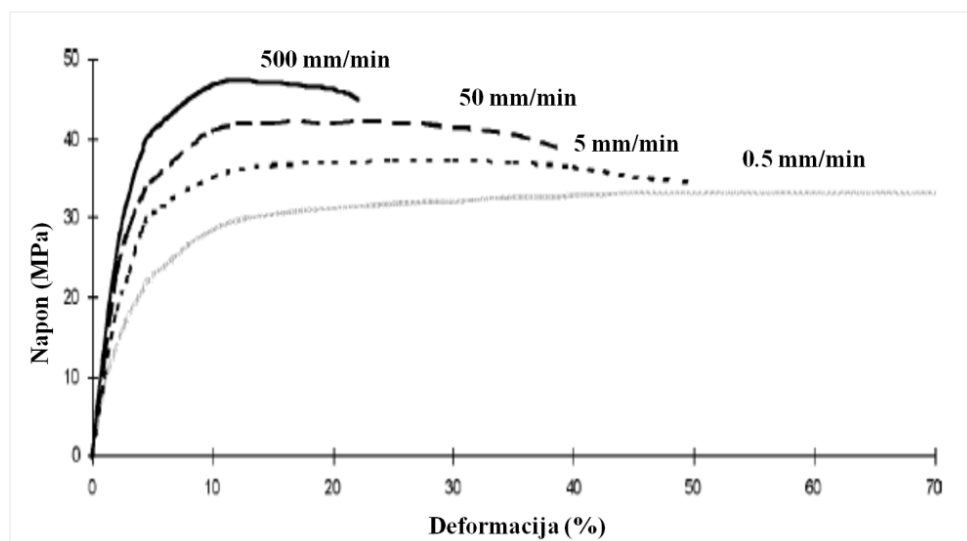
Dva osnovna modula koja se određuju kod polimernih materijala su tangenti modul i sekant modul. Tangenti modul (GPa) predstavlja odnos napona i deformacije u tački na polupravoj koja polazi iz koordinatnog početka i tangenta je na početni deo krive. Sekant modul (GPa) predstavlja odnos napona i deformacije pri određenoj vrednosti deformacije, najčešće 1%. Pri izboru druge vrednosti deformacije dobiće se drugačija vrednost sekant modula (Slika 24).





Slika 24. Tangentni modul i sekant modul (Brown, 2002)

Polimeri su viskoelastični materijali i, kao posledica toga, ponašanje im je zavisno od vremena delovanja sile. Zato je pri određivanju zateznih svojstava važno naglasiti brzinu istezanja u testu da bi rezultati bili međusobno uporedivi. Na *Slici 25.* je prikazan uticaj brzine istezanja materijala HDPE na izgled krive napon-deformacija.



Slika 25. Grafik napon-deformacija za HDPE na 23 °C pri različitim brzinama istezanja (Brown, 2002)

Sa *Slike 25.* se može primetiti da se izmerene vrednosti jačine materijala, a samim tim i moduli, povećavaju sa povećanjem brzine istezanja. Pri malim brzinama istezanja, ne uočava se granica elastičnosti materijala, jer molekuli HDPE, pri ovoj brzini, imaju dovoljno vremena da se poređaju tako da mogu prihvatiti povećanje deformacije održavajući otpornost na delovanje sile (konstantna vrednost napona istezanja). Sa porastom brzine istezanja, javlja se granica elastičnosti, a ukoliko bi se brzina dovoljno uvećala materijal bi se ponašao kao krti polimer (Brown, 2002).

Prema Skurtys *i sar.* (2010) hidrokolidni filmovi imaju mehanička svojstva koja odgovaraju grupi materijala kod kojih je napon na granici elastičnosti manji od napona

kidanja, odnosno zatezne jačine materijala (Slika 21). Vrednosti zatezne jačine polisaharidnih filmova kreću se od 10 MPa do 100 MPa, a istezanja pri kidanju, (1 - 80)%. Generalno, proteinski filmovi imaju niže vrednosti zatezne jačine, dok su vrednosti izduženja pri kidanju za ove hidrokolojne filmove nešto više, u poređenju sa polisaharidnim filmovima. Zatezna svojstva biopolimera zavise od različitih faktora, od kojih su neki: karakteristike polimera (molekulska masa, hemijska priroda, derivatizacija), sastav filmogenog rastvora (vrsta i koncentracija rastvarača, dodatak plastifikatora, drugog polimera, agensa za umrežavanje, nanovlakana), relativna vlažnost vazduha tokom skladištenja, temperatura sušenja, dužina skladištenja.

Azeredo *i sar.* (2009) su koristili celulozna nanovlakna da poboljšaju mehanička svojstva filma na bazi homogenizovanog manga. Upotrebom nanovlakana poboljšana je zatezna jačina filma formiranjem fibrilarne mreže uvezane vodoničnim vezama sa izraženim međupovršinskom interakcijom matriks/punioč. Za povećanje zatezne jačine polisaharidnih filmova koriste se i agensi za umrežavanje, umrežavanje elektromagnetnim zračenjem ili toplotom ili druga polimerna supstanca koji se dodaju filmogenom rastvoru (Ghanbarzadeh i Almasi, 2011; Olabarrieta, 2005). Skrobnom filmu je kao agens za umrežavanje dodata limunska kiselina i drugi polimer karboksimetilceluloza. Sa povećanjem udela agensa za umrežavanje, povećavala se i zatezna jačina biofilma. Preko karboksilnih grupa kiseline je došlo do umrežavanja formiranjem jakih vodoničnih veza sa hidroksilnim grupama skroba. Takođe, dodatkom drugog polimera, karboksimetilceluloze u skrob došlo je do povećanja zatezne jačine skrobnog filma (Ghanbarzadeh and Almasi 2011).

Brzina i temperatura sušenja filma utiče na njegova mehanička svojstva. Fernandez-Pan *i sar.* (2010), Mayachiew i Devahastin (2008) kao i Srinivasa *i sar.* (2004) su analizirali uticaj temperature sušenja na mehanička svojstva hitozanskih filmova. Veće vrednosti zatezne jačine i izduženja pri kidanju su dobijene sporim procesom sušenja pri sobnim uslovima. Brže sušenja na visokim temperaturama rezultira slabije organizovanom strukturom sa manjim brojem uspostavljenih vodoničnih veza, dok tokom sporog procesa sušenja polimerni lanci imaju vremena da se preraspodele i formiraju bolje organizovanu strukturu.

Plastifikatori su niskomolekularne supstance koje se koriste kao aditivi u preradi polimera. Savet internacionalne unije za čistu i primenjenu hemiju (IUPAC) je definisao plastifikatore kao supstance ili materijal inkorporiran u materijal (najčešće plastični ili elastomer) da bi povećao fleksibilnost, obradivost ili istegljivost. Ove supstance smanjuju napon deformacije, tvrdoću, gustinu, viskozitet i elektrostatički naboj polimera. Kod biopolimera, dodatak plastifikatora umanjuje broj intermolekulskih vodoničnih veza između molekula polimera, povećavajući fleksibilnost i pokretljivost lanaca. Oni se dodaju sa ciljem povećanja fleksibilnosti, smanjenja krutosti i izbegavanja pojave skupljanja filma tokom sušenja i skladištenja. Na svojstvo biofilma utiče priroda plastifikatora i njegova koncentracija. Sa dodatkom plastifikatora često dolazi i do drugih promena u filmu gde, pored opadanja zatezne jačine može doći do povećanja propustljivosti za gasove i vodenu paru. Zato se željene karakteristike biopolimernog filma mogu postići uspostavljanjem ravnoteže između stepena umreženosti i plastifikacije polimera. Iznad kritične koncentracije plastifikatora moguće je premašiti granicu kompatibilnosti plastifikatora usled čega dolazi do izdvajanja

plastifikatora iz polimernog matriksa. Najčešće korišćeni plastifikatori su polioli (glicerol, etilen glikol, dietilen glikol, trietilen glikol, polietilen glikol, propilen glikol, sorbitol, manitol i ksilitol), masne kiseline, monosaharidi (glukoza, manoza, fruktoza, saharoza), etanolamin, urea, trietanolamin, ulje iz povrća, lecitin, voskovi, aminokiseline, surfaktanti i voda (Vieira *i sar.*, 2011). Na zatezna svojstva biopolimera utiče sadržaj vlage u polimeru, jer molekuli vode deluju kao plastifikatori. Sa povećanjem sadržaja vlage povećava se elastičnost i fleksibilnost, a smanjuje zatezna jačina biopolimera. Zato je test potrebno izvoditi na kondicioniranom uzorku u definisanim uslovima sredine, koji su najčešće 50% RH i 23°C (Rossman, 2009).

Tokom stajanja hitozanskih biofilmova je došlo do promene mehaničkih svojstava filmova: zatezna jačina je ostala ista, ali se vrednost izduženja pri kidanju smanjivala (Caner *i sar.*, 1998). U drugom istraživanju, gde je ispitivan uticaj perioda skladištenja na svojstva hitozanskih biofilmova, zapažena je drugačija promena mehaničkih svojstava, zatezna jačina je opadala, a izduženje pri kidanju se povećavalo tokom skladištenja (Butler *i sar.*, 1996).

Rastvaranjem hitozana u različitim organskim kiselinama: sirćetnoj (1% i 7.5%), mravljoj (1% i 7.5%), mlečnoj (1%, 7.5%) i propionskoj (1% i 7.5%), dobijeni su filmovi približnih vrednosti istezanja pri kidanju, osim filma dobijenog rastvaranjem u 7.5% mlečnoj kiselini koji je imao značajno veću vrednost ovog parametra. Filmovi dobijeni upotrebom sirćetne i mravlje kiseline su imali veće vrednosti zatezne jačine od filmova sa propionskom i mlečnom kiselinom 1%, dok je film sa mlečnom kiselinom 7.5% imao najmanju vrednost zatezne jačine. Pored uticaja izbora kiselina za rastvaranje hitozana, na mehanička svojstva utiče i koncentracija kiseline (Caner *i sar.*, 1998). Takođe, razlivanjem hitozanskog filma iz rastvora u sirćetnoj, limunskoj, mlečnoj i maleinskoj kiselini, dobijeni su filmovi među kojima je film sa najvećom vrednošću zatezne jačine bio film sa sirćetnom kiselinom, a sa najvećim izduženjem pri kidanju film sa limunskom kiselinom (Park *i sar.*, 2002).

Sa porastom molekulske mase, stepena deacetilovanosti i koncentracije hitozana u filmogenom rastvoru, raste zatezna jačina formiranih filmova (Park *i sar.*, 2002; Trung *i sar.*, 2009; Kim *i sar.*, 2006).

Hitozanski filmovi formirani iz filmogenog rastvora niže pH imaju veće vrednosti zatezne jačine (Kim *i sar.*, 2006).

## 2.6.2. Fizičko-hemijska svojstva biofilmova

### 2.6.2.1. Sadržaj vlage, bubrenje i rastvaranja

Hidrofilni polimeri koji sadrže polarne grupe koje omogućavaju formiranje vodoničnih veza apsorbiraju vodu iz vazduha ili iz prehrambenog proizvoda sa kojim su u kontaktu. Povećani sadržaj vlage u polimeru uzrokuje promene u mehaničkim i barijernim svojstvima. Voda u strukturi polimera deluje kao plastifikator. Zato se za predviđanje ponašanja polimera izrađuju eksperimentalne apsorpcione izoterme koje pokazuju sadržaj vlage u polimeru pri različitim uslovima relativne vlažnosti vazduha. Na izgled apsorpcione izoterme utiče koncentracija plastifikatora, gde proporcionalno povećanju sadržaja plastifikatora raste ravnotežni sadržaj vlage u filmu. Suprotno deluje prisustvo hidrofobne komponente: lipida, ulja, etarskih ulja, voskova (Coupland *i sar.*, 2000; Kim i Ustunol, 2001). Temperatura i metod sušenja uticali su na ravnotežni sadržaj vlage hitozanskog biofilma. Film sušen pri ambijentalnim uslovima imao je najviši ravnotežni sadržaj vlage, u odnosu na filmove sušene na višim temperaturama ili pod vakuumom (Mayachiew i Devahastin, 2008).

Molekuli hitozana su u formi soli u filmu. Potapanjem u vodu ili vodeni rastvor, u prisustvu hidronijum jona, dolazi do jonizacije protonovanih amino grupa i rastvaranja filma. Pre samog rastvaranja, film bubri i prelazi u gel, postupno se rastvarajući. Bubrenje i rastvaranje filma je značajno brže kod filmova na bazi hitozana niske molekulske mase u odnosu na filmove na bazi visokomolekularnih hitozana. Visokomolekularni hitozan u filmu intenzivno bubri, sporo otpuštajući manje čestice u rastvor ili vodu. Sposobnost bubrenja je veća za film od hitozana male molekulske mase. Na brzinu rastvaranja i sposobnost bubrenja utiče i stepen deacetilovanosti hitozana, pri čemu se sporije rastvara i ima manju sposobnost bubrenja film na bazi hitozana većeg stepena deacetilovanosti, u opsegu DD (80 - 100)%. Sa porastom vrednosti pH filmogenog rastvora pre formiranja filma, raste brzina rastvaranja filma. Rastvaranje, kao i bubrenje je intenzivnije u kiselom i baznom pH u odnosu na neutralni pH. Kako bubrenje i rastvaranje obuhvata difuziju vode, jonizaciju amino i karboksilne grupe i relaksaciju molekula, u kiseloj sredini se ovi procesi intenziviraju jonizacijom amino, u baznoj jonizacijom karboksilne grupe, dok u neutralnim uslovima prevladavaju fenomeni difuzije i relaksacije molekula (Nunthanid *i sar.*, 2001; Kim *i sar.*, 2006; Mathew *i sar.*, 2006). Na brzinu rastvaranja utiče i kiselina koja je korišćena za rastvaranje hitozana, pa se tako najbrže rastvaraju filmovi dobijeni iz mlečne kiseline, zatim mravlje, propionske i na kraju sirćetne (Kim *i sar.*, 2006). Upotrebom agenasa za umrežavanje ili dodatkom drugog polimera, kao i dodatkom lipidne komponente u film, moguće je smanjiti rastvorljivost u vodi, kao i stepen bubrenja. Takođe, starenjem filma dolazi do smanjenja rastvorljivosti i smanjenja sadržaja vlage zbog pojačanog umrežavanja filma (García *i sar.*, 2004; Jones, 2010; Bourtoom i Chinnan, 2009; Suyatma *i sar.*, 2005).

### 2.6.2.2. Boja

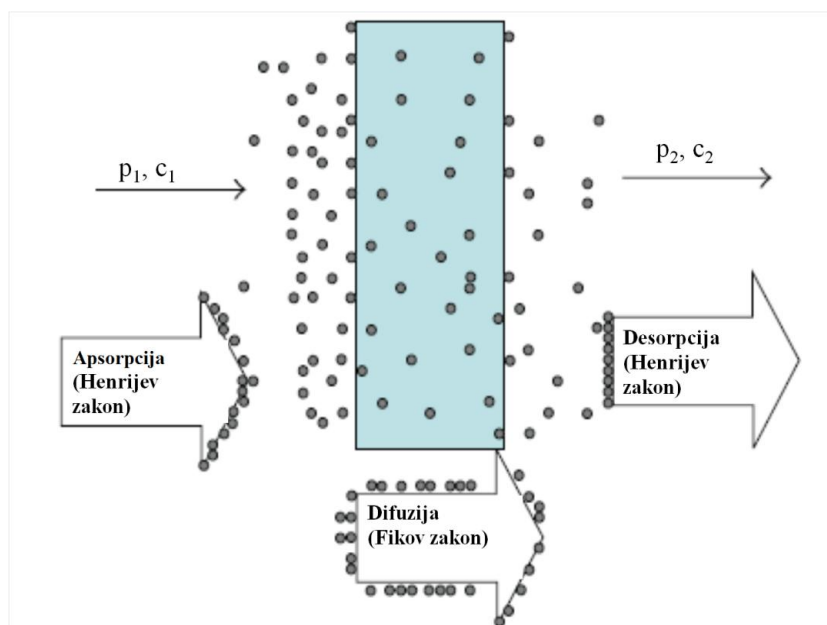
Optičke karakteristike površine biorazgradivog filma, boja, sjaj i prozirnost, važne su osobine filma koje utiču na potencijalnu primenu filma kao ambalažnog materijala. Optičke osobine karakterišu površinu proizvoda, koja je od krucijalnog značaja za budućeg konzumenta. Takođe, prozirnost i boja određuju propustljivost svetlosti kroz film, utičući time na hemijske promene upakovanog sadržaja. Unutrašnja i spoljašnja mikrostruktura filma igra važnu ulogu u određivanju optičkih karakteristika filma (Skurtys *i sar.*, 2010). Hitozanski filmovi su prozirni, sjajni, blago žućkasti, pri čemu intenzitet obojenja raste sa porastom koncentracije hitozana u filmu i sa starenjem filma. Boja hitozanskog filma zavisi i od kiseline u kojoj je rastvoren hitozan pri pripremi filmogenog rastvora. U propionskoj kiselini su formirani bezbojni filmovi. Bez obzira na žućkastu nijansu filma, u odnosu na proteinske filmove, kao što su filmovi na bazi proteina surutke obojenje hitozanskog filma je minimalno. Takođe, tokom skladištenja proteinski i lipidni filmovi često menjaju boju usled odvijanja Mailadrove reakcije kod proteina, odnosno užegnuća lipida. Polisaharidni filmovi ne podležu ovim reakcijama (García *i sar.*, 2004). Blago zamućenje filma može doprineti očuvanju upakovanog proizvoda smanjujući njegovu izloženost ultravioletnim zracima, ipak zamućenje onemogućava vidljivost proizvoda za potrošača, što je od velikog značaja (Rubilar *i sar.*, 2013).

### 2.6.3. Barijerna svojstva biofilmova

Propustljivost ambalažnih materijala za gasove i vodenu paru su dva osnovna barijerna svojstva, čije je određivanje od velikog značaja u primeni materijala za procenu održivosti upakovanog proizvoda. Određivanje propustljivosti materijala za kiseonik, ugljendioksid i azot omogućava određivanje propustljivosti materijala za vazduh računskim putem. Dostupnost kiseonika u ambalaži je osnovni faktor koji pokreće proces lipidne peroksidacije, inicirajući lanac degradirajućih reakcija, narušavajući pritom i organoleptička svojstva proizvoda (Sothornvit i Pitak, 2007; Russo *i sar.*, 2006). Propustljivost materijala za ugljendioksid takođe ima veliki značaj u produženju održivosti proizvoda koji „dišu“, kao i proizvoda pakovanih u modifikovanoj atmosferi (MAP-u). Propustljivost vodene pare je podjednako važno barijerno svojstvo jer fizički i hemijski kvalitet upakovanog proizvoda zavisi od ravnotežnog sadržaja vlage u proizvodu. Sa jedne strane, važno je sprečiti isušivanje proizvoda, a sa druge strane hrskavi proizvodi ne bi trebalo da budu izloženi atmosferi sa velikim sadržajem vlage. Zahtev za određenim barijernim svojstvima ambalažnog materijala zavisi od vrste upakovanog proizvoda, namene sistema proizvod-ambalaža i željenog roka održivosti proizvoda.

Više različitih faktora utiče na barijerna svojstva biofilmova, među kojima: uslovi okoline (temperatura i relativna vlažnost vazduha), kontakt sa upakovanom hranom, stepen kristalnosti i odnos kristalne i amorfne faze u polimeru (propustljivost gasova se odvija samo kroz amorfne zone u polimeru), koncentracija i struktura polimera (polarnost, linearnost), prisustvo i koncentracija plastifikatora, stepen umreženosti, dodatak hidrofobne komponente, tretmani tokom i nakon pakovanja, debljina, površina, razlika pritiska ili koncentracioni gradijent u filmu (Mrkić *i sar.*, 2006; Galić *i sar.*, 2000).

Propustljivost se definiše kao mera prolaza permeata, gasa ili pare, kroz otporni materijal (Pauly, 1999). Kao što je Siracusa (2012) predstavila u radu koji je dao pregled barijernih svojstava ambalažnih materijala, u materijalu (filmu ili omotaču) bez perforacija, pora i naprslina, primarni mehanizam protoka gasa i vodene pare je aktivna difuzija. Permeat se rastvara u matriksu filma sa strane filma gde je veća koncentracija datog permeata, difunduje kroz film pod uticajem koncentracionog gradijenta i desorbuje se sa druge površine materijala. Uprošćen prikaz propustljivosti gasova ili vodene pare kroz polimernu homogenu monoslojnu membranu je prikazan na Slici 26.



Slika 26. Osnovni mehanizam propuštanja gasova i vodene pare kroz polimerni film ili omotač (kružići predstavljaju molekule gasa ili vodene pare) (Siracusa, 2012)

Označeni su pritisci permeata,  $p_1 > p_2$  i koncentracije permeata,  $c_1 > c_2$  sa jedne i sa druge strane membrane. U prikazanom primeru, fluks permeata ( $J$ ) se izračunava na osnovu prvog Fikovog zakona:

$$J = -D \Delta c, \quad (3)$$

koji za jednodimenzionu difuziju kroz polimernu membranu u stacionarnim uslovima može biti predstavljen jednačinom:

$$J = -D (\Delta c/l) \quad (4)$$

gde je  $J$  difuzioni fluks ( $\text{mol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ ),  $D$  je koeficijent difuzije ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) i  $\Delta c$  je razlika koncentracija ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) kroz membranu debljine  $l$  (cm). Kada je mehanizam difuzije u stacionarnom stanju, ravnotežne koncentracije gasa na površini i parcijalni pritisci gasa se pokoravaju Henrijevom zakonu. U slučaju kada je permeat gas, mogu se umesto koncentracija koristiti pritisci gasa na površini materijala, pa se  $\Delta c$  u prethodnim jednačinama može zameniti sa  $S \Delta p$ , gde je  $S$  ( $\text{mol}/\text{cm}^3 \text{ atm}$ ) koeficijent rastvorljivosti, koji odražava količinu permeata u polimeru. Difuzioni fluks se može izraziti kao:

$$J = -D (S \Delta p/l) \quad (5)$$

Proizvod DS se naziva koeficijent propustljivosti (P, permeability). Odnos P/l se označava sa q i predstavlja propustljivost (permeance). Fikov zakon važi za difuziju koja se odvija samo u jednom pravcu kroz film, a D i S koeficijenti su nezavisni od koncentracije permeata. U realnosti, mnogo je slučajeva koji odstupaju od ovog zakona: ukoliko je potrebno dugo vremena da se uspostavi ravnotežno stanje ili kada su D i S koeficijenti u korelaciji sa interakcijom između permeata i polimera (molekul vode i hidrofilni polimer, molekuli rastvarača u polimeru).

Kada su u pitanju laminirani materijali, njihova propustljivost za gasove i vodenu paru je opisana teorijom idealnih laminata, koju su opisali Grüniger and Von Rohr. Ukupna propustljivost laminata  $P_L$ , zavisi od debljine  $l_i$  i propustljivosti  $P_i$  pojedinih slojeva (L) u materijalu:

$$\frac{P_L}{\sum l_i} = \frac{1}{\sum (l_i/P_i)} = \frac{TR_L}{\Delta p} \quad (6)$$

Za laminate se često umesto koeficijenta propustljivosti (P) koristi brzina propustljivosti (TR), koja se definiše kao količina permeata koja prolazi kroz film po jedinici površine u jedinici vremena u stacionarnom stanju. U ovom modelu raspored slojeva laminata nema uticaja. Manometrijski metod za određivanje parametara propustljivosti gasova je najčešći, jednostavan i ekonomičan metod. Brzina propustljivosti gasa se izražava kao zapremina permeata koja prolazi kroz film po jedinici površine u jedinici vremena pri definisanoj pri definisanoj razlici pritisaka u stacionarnom stanju:  $\left(\frac{\text{cm}^3}{\text{m}^2 \text{ d bar}}\right)$ , pri čemu se uslovi testiranja: temperatura i vlažnost vazduha moraju naglasiti. Kada je permeat vodena para, brzina propustljivosti vodene pare se izražava kao masa vode po jedinici površine u jedinici vremena:  $\left(\frac{\text{g}}{\text{m}^2}\right)$ , pri čemu je potrebno naglasiti uslove ispitivanja: temperaturu i relativnu vlažnost sa obe strane filma (Siracusa, 2012).

Hitozanski filmovi su dobra barijera za kiseonik, zahvaljujući velikom broju vodoničnih veza u strukturi gde su dugački linearni molekuli čvrsto spakovani (Martins *i sar.*, 2012; Bourbon *i sar.*, 2011; Rubilar *i sar.*, 2013). Propustljivost hitozanskog biofilma za gasove je u skladu sa nizom:  $\text{CO}_2 > \text{O}_2 > \text{N}_2$ , najverovatnije zbog kiselo-bazne interakcije hitozana i  $\text{CO}_2$  (Liu, 2008). Propustljivost hidrokolidnih filmova zavisi od temperature, relativne vlažnosti i razlike u pritisku sa različitih strana filma. Sa porastom temperature i relativne vlažnosti vazduha raste propustljivost filma (Bonilla *i sar.*, 2012, Liu, 2008). Pored ambijentalnih uslova, na barijerna svojstva utiče i veliki broj drugih faktora. Sa dodatkom plastifikatora u film i sa povećanjem koncentracije plastifikatora, propustljivost filma za gasove i vodenu paru raste. Rastvaranjem hitozana u različitim organskim kiselinama, dobijaju se filmovi koji se razlikuju po barijernim svojstvima, pri čemu je uticaj vrste i koncentracije kiseline koja je korišćena daleko izraženiji na propustljivost za gasove, u odnosu na propustljivost za vodenu paru. Prema vrednosti propustljivosti za vodenu paru, hitozanski biofilmovi dobijeni rastvaranjem hitozana u različitim kiselinama, se mogu poredati u rastući niz: sirćetna < propionska < mravlja < mlečna, dok je u zavisnosti od propustljivosti za kiseonik redosled bio: mlečna < sirćetna < propionska < mravlja. Pokazano je da, tokom stajanja filma, njegova barijerna svojstva ostaju nepromenjena ili propustljivost

opada tokom vremena skladištenja (Butler *i sar.*, 1996; Caner *i sar.*, 1998; Park *i sar.*, 2002; Casariego *i sar.*, 2007). Sa dodatkom agensa za umrežavanje, opada propustljivost hitozanskog filma (Mathew i Abraham, 2008; Zhang *i sar.*, 2009). Dodatkom drugog hidrokoloidea u film, može se uticati na propustljivost hitozanskog filma. Dodatak kukuruznog skroba u hitozanski film do 40%, uticao je na smanjenje propustljivosti hitozanskog filma za kiseonik, ugljendioksid i azot pri niskoj relativnoj vlažnosti, najverovatnije usled formiranja dodatnih vodoničnih veza između dva polisaharida. Sa druge strane, dodatak proteina iz surutke u hitozanski film nije doveo do promene propustljivosti hitozanskog filma za kiseonik, dok je propustljivost za CO<sub>2</sub> i vodenu paru rasla sa rastućom koncentracijom proteina u hitozanskom biofilmu (Liu, 2008; Zhang *i sar.*, 2009). Propustljivost hitozanskog filma za vodenu paru je rasla i sa dodatkom želatina u biofilm, kao i hidrosipropilmetilceluloze (Rivero *i sar.*, Sukkunta, 2005; Sebti *i sar.*, 2007). Povećanje koncentracije karvakrola, kao lipofilne komponente u matriksu filma, uz smanjenje koncentracije ekstrakta iz semenki grožđa, doprineo je smanjenju propustljivosti za vodenu paru i ugljendioksid, kao i povećanju propustljivosti za kiseonik (Rubilar *i sar.*, 2013). Do povećanja propustljivosti za kiseonik je došlo i nakon inkorporiranja etarskog ulja timijana (Altiok *i sar.*, 2010). Kada je sam karvakrol dodat u hitozanski biofilm, došlo je do povećanja propustljivosti filma za vodenu paru, kiseonik i ugljendioksid, mereno pri niskom RH. Pri većem RH, doprinos hidrofobnog karaktera karvakrola hitozanskom filmu je uočljiv i propustljivost za gasove je niža u odnosu na film bez karvakrola (Kurek *i sar.*, 2014). U literaturi su prikazane različite tendencije promene propustljivosti vodene pare hitozanskog biofilma sa dodatkom hidrofobne komponente, od porasta propustljivosti filma (Altiok *i sar.*, 2010; Kurek *i sar.*, 2014), bez promene propustljivosti filma (Rojas-Grau *i sar.*, 2007; Pranoto *i sar.*, 2005) do sniženja propustljivosti (Zivanovic *i sar.*, 2005; Rubilar *i sar.*, 2013; Wang *i sar.*, 2013; Vargas *i sar.*, 2009; Peng i Li, 2014; Ojagh *i sar.*, 2010). Propustljivost za vodenu paru sa dodatkom lipofilne komponente zavisi od koncentracije hitozana, prirode i koncentracije lipofilne komponente, uslova homogenizovanja emulzije i svih već navedenih faktora od kojih zavisi propustljivost hitozanskog filma (Bonilla *i sar.*, 2012<sup>a</sup>; Bourtoom i Chinan, 2009).



## 2.6.4. Strukturna svojstva biofilmova

### 2.6.4.1. ATR-FTIR spektroskopija

Furije transformišuća infracrvena spektroskopija (FTIR) se koristi za identifikaciju organskih i neorganskih supstanci u sva tri agregatna oblika. Furijeova transformacija podrazumeva konvertovanje osnovnog snimljenog signala u spektar koji se analizira. Pored kvalitativne analize, FTIR se može koristiti i za kvantitativna određivanja jer je intenzitet pika u spektru proporcionalan koncentraciji funkcionalnih grupa u ispitivanoj supstanci (Jamaluddin, 2009). Infracrveni zrak prolazi kroz uzorak i izaziva vibraciju, istezanje, savijanje i kontrakciju hemijskih veza. Kada se ovo dogodi, ekscitovana hemijska veza je apsorbovala infracrveno zračenje specifične talasne dužine ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Goddard i Hotchkiss, 2007; Lin, 2012). Kada se koristi ATR-FTIR tehnika (attenuated total reflection), uzorak se pozicionira na visokoreflektujući kristal (dijamant) i izloži infracrvenom zračenju da bi se utvrdila putanja reflektovanog zraka (Tanaka *i sar.*, 2001). Za primenu ovog testa potrebna je mala količina uzorka, analiza traje kratko i nije destruktivna (Siracusa *i sar.*, 2008). Dobijeni ATR-FTIR spektar može biti upotrebljen da se odredi biohemijski sastav i hemijske promene testiranog uzorka, a posebno se analizira region talasnih dužina ( $1500 - 400$ )  $\text{cm}^{-1}$ , koji se smatra „otiskom prsta“ jedinjenja. Ovom tehnikom se, pored identifikovanja hemijskih veza prisutnih u biofilmu, može utvrditi i prisustvo plastifikatora, emulgatora i drugih aktivnih ili funkcionalnih komponenti (Lin, 2012). Za uobičajene materijale, identifikacija se može izvršiti poređenjem snimljenog spektra sa spektrima iz biblioteke baza spektara, dok se za identifikovanje neuobičajenih jedinjenja, FTIR kombinuje sa drugim tehnikama za identifikaciju (nuklearna magnetna rezonanca, masena spektrometrija, emisiona spektrometrija, difrakcija X-zraka) (Jamaluddin, 2009; Lin, 2012).

### 2.6.4.2. Elektron skenirajuća mikroskopija (SEM)

Elektron skenirajuća mikroskopija se primenjuje za ocenu homogenosti filma, strukture, glatkoće površine, debljine, prisutnosti pora i pukotina (Saremnzhad *i sar.*, 2011). Ova metoda omogućava posmatranje i karakterizaciju heterogenih organskih i neorganskih materijala u nanometarskim i mikrometarskim razmerama. Pored analize površine filma, moguće je izvršiti i analizu izgleda preseka filma (Marques, 2012). Princip ove metode se zasniva na interakciji elektronskog snopa sa površinom materijala, pri čemu izazvani signal mogu biti sekundarni elektroni ili X-zraci. Oslobođeni sekundarni elektroni, nakon interakcije snopa sa analiziranom površinom, omogućavaju formiranje slike u mikroskopu. Primarni snop elektrona je mobilan i snima površinu uzorka, na osnovu čega se dobije kompletna slika. Pre izlaganja snopu elektrona, površina uzorka se obradi tako da bude provodnik. Naime, na površinu uzorka se nanese tanak sloj zlata (Marques, 2012). Elektron skenirajuća mikroskopija je kvalitetna tehnika i za karakterizaciju strukture laminiranih i kompozitnih filmova i pruža informacije o strukturi svakog sloja i o homogenosti kompozita. Kod dobro homogenizovanih kompozitnih filmova na bazi hidrokoloida i lipida mogu se uočiti uniformno raspoređene mikropore koje potiču od dispergovane faze, slično kao kod emulzija.

Kod kompozitnih filmova na bazi polisaharida i drugog biopolimera, struktura je gušća i kompaktnija (Elizondo *i sar.* 2009; Popović, 2013).

## 2.6.5. Antioksidativna aktivnost hitozana i hitozanskog filma

### 2.6.5.1. Antioksidansi, definicija, podela i testovi za određivanje antioksidativne aktivnosti

Opšta definicija antioksidansa podrazumeva sve supstance, koje u koncentracijama znatno nižim od koncentracije supstrata koji može da se oksiduje, značajno smanjuju ili sprečavaju njegovu oksidaciju. U širem smislu, antioksidans je zapravo agens koji onemogućava, sprečava ili uklanja oksidativna oštećenja ciljanog molekula (Halliwell, 1995).

Na osnovu različitog mehanizma delovanja, antioksidansi mogu biti:

1) Primarni antioksidansi, koji usporavaju inicijaciju lančane reakcije slobodnih radikala ili prekidaju lančanu reakciju u fazi propagacije, donirajući vodonik ili elektrone slobodnim radikalima i transformišući slobodne radikale u stabilnije produkte. Oni obično reaguju sa peroksil ili alkoksil slobodnim radikalima, koji nastaju razlaganjem lipidnih hidroperoksida. Efikasni su pri manjim koncentracijama, dok pri višim koncentracijama mogu pokazati prooksidativno dejstvo. Primeri primarnih antioksidanasa su: fenoli, troloks-C, anoksomer, BHA- Butilhidroksianizol, BHT- Butilhidroksitoluen i etoksikvin, galati, flavonoidi, ruzmarinski ekstrakt, vitamin E, itd.

2) Sekundarni ili preventivni antioksidansi, koji sprečavaju razlaganje lipidnih hidroperoksida na slobodne radikale tj. redukuju brzinu reakcije inicijacije kod lančanih reakcija različitim mehanizmima inaktivacije metala, raspadanja lipidnih hidroperoksida na neradikalske produkte, uklanjanja kiseonika, vezivanja određenih proteina sa prooksidativnim dejstvom, apsorbujući ultraljubičastvo zračenje ili (u slučaju fosfolipida) stvaraju zaštitni sloj između ulja i vazduha. Sekundarni antioksidansi ne transformišu slobodne radikale u stabilnije produkte. Primeri sekundarnih antioksidanasa su: limunska kiselina, askorbinska kiselina, sumporna jedinjenja, selen, fosfolipidi, karotenoidi, transferin, ceruloplazmin, itd.

3) Sinergisti, koji nemaju antioksidativno dejstvo ili imaju veoma slab efekat, ali pojačavaju aktivnost primarnih antioksidanasa. U sinergiste spadaju antioksidansi koji vežu kiseonik ili "skevindžeri" (hvatači) kiseonika (askorbinska kiselina, sulfiti, askorbil-palmitat, eritorbinska kiselina) i helatori metala (limunska kiselina, EDTA, fosfati, amino kiseline, fosfolipidi, produkti Mailard-ove reakcije).

Često se u literaturi sreće podela gde sekundarni antioksidansi i sinergisti čine jednu grupu koja se naziva sekundarni antioksidansi i sinergisti (Schreiber, 2012; Babović, 2010). Uloga antioksidansa nije da poboljša kvalitet hrane, već da održi kvalitet i produži trajnost proizvoda (Reische *i sar.*, 2008). Uopšteno, testovi za određivanje antioksidativnog potencijala u biološkim sistemima i namirnicama mogu biti zasnovani na:

- sposobnosti hvatanja slobodnih radikala
- transferu elektrona

- inhibiciji lipidne peroksidacije

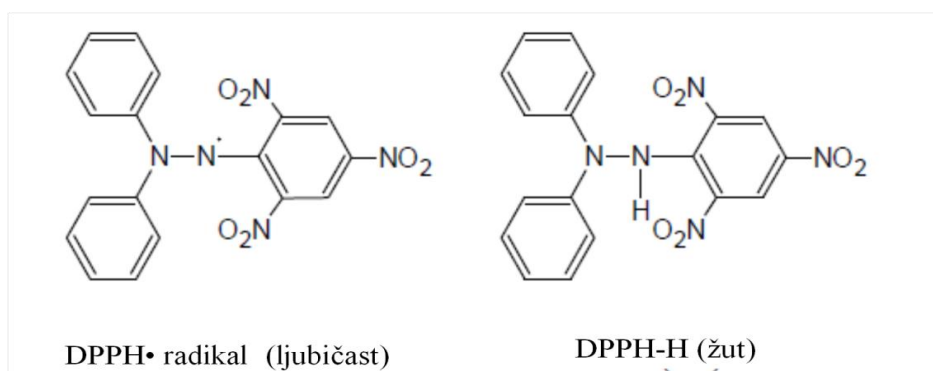
Zbog velikog broja reaktivnih hemijskih vrsta koje narušavaju kvalitet lipida u hrani i raznolikosti mehanizma njihovog delovanja, nemoguće je definisati jedinstveno merilo antioksidativne aktivnosti. U procesu evaluacije antioksidativnog potencijala ispitivane supstance, potrebno je izabrati kombinaciju više testova koji se zasnivaju na različitim principima i pokazuju antioksidativni potencijal ispitivane supstance putem različitih mehanizama delovanja. U *Tabeli 3.* su navedene neke od metoda koje mogu da se primene za određivanje antioksidativnog potencijala različitih agenasa (Lesjak, 2011).

**Tabela 3. Najčešće korišćene metode za određivanje antioksidativnog potencijala (Lesjak, 2011)**

Metoda	Princip <i>Sposobnosti hvatanja slobodnih radikala</i>
Određivanje kapaciteta hvatanja superoksid anjon radikala	<ul style="list-style-type: none"> <li>• merenje procenta inhibicije stvaranja <math>\bullet\text{O}_2^-</math>, generisanog u reakciji fenazin-metilsulfata (PMS) u prisustvu NADH i molekuskog kiseonika ili hipoksantin/ksantin-oksida za sistem; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)</li> <li>• merenje procenta inhibicije stvaranja etena u reakciji generisanog <math>\bullet\text{O}_2^-</math> sa <math>\alpha</math>-ketometiolbutenom kiselinom (KMB); praćenje: gasnom hromatografijom (MacDonald-Wicks <i>i sar.</i>, 2006)</li> <li>• „hvatanje“ generisanog <math>\bullet\text{O}_2^-</math>, 5,5-dimetil-1-pirolin-<i>N</i>-oksidom; praćenje: elektron spin rezonantna (ESR) spektrofotometrija (MacDonald-Wicks <i>i sar.</i>, 2006)</li> </ul>
Određivanje kapaciteta hvatanja hidroksil radikala	<ul style="list-style-type: none"> <li>• „deoksiriboza test“: merenje procenta inhibicije stvaranja malonildialdehida (MDA), nastalog oksidativnim dejstvom Fentonovom reakcijom generisanog <math>\text{HO}\bullet</math> na deoksiribozu; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)</li> <li>• HORAC test (<i>hydroxyl radical averting capacity</i>): merenje procenta inhibicije hidroksilacije <i>p</i>-hidroksibenzoeve kiseline <math>\text{HO}\bullet</math> generisanim Fentonovom reakcijom sa <math>\text{Co}^{2+}</math>; praćenje: visokopritisnom tečnom hromatografijom sa maseno spektrometrijskim detektorom (MacDonald-Wicks <i>i sar.</i>, 2006)</li> <li>• 3D test: merenje procenta inhibicije stepena oštećenja DNK izazvanog <math>\text{HO}\bullet</math> generisanim u Fentonovoj reakciji (Sánchez-Moreno, 2002)</li> <li>• merenje procenta inhibicije peroksidacije lipozoma ili linoleinske kiseline izazvane <math>\text{ROO}\bullet</math> generisanim iz azo jedinjenja; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)</li> </ul>
Određivanje kapaciteta hvatanja peroksil radikala	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TRAP test (<i>total radical-trapping antioxidant parameter assay</i>): određivanje antioksidativnog statusa humane plazme praćenjem potrošnje kiseonika tokom oksidativnog procesa (generisanje <math>\text{ROO}\bullet</math> termalnom dekompozicijom vodorastvornog azo-inicijatora) i poređenje sa Troloksom; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks <i>i sar.</i>, 2006)</li> <li>• ORAC test (<i>oxygen radical absorbance capacity assay</i>): merenje procenta inhibicije promene fluorescencije B-fikoeritrina ili fluoresceina u prisustvu azo-generatora <math>\text{ROO}\bullet</math>; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks <i>i sar.</i>, 2006)</li> <li>• merenje procenta inhibicije izbeljivanja karotenoida krocina u prisustvu azo-generatora <math>\text{ROO}\bullet</math>; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)</li> </ul>
	<i>Transfer elektrona</i>
Određivanje neutralizacije DPPH• radikala	merenje procenta neutralizacije stabilnog DPPH• radikala; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks <i>i sar.</i> , 2006)
Određivanje	TEAC test ( <i>trolox equivalent antioxidant capacity</i> ): merenje procenta neutralizacije

neutralizacije ABTS <sup>•+</sup> radikala	ABTS <sup>•+</sup> radikala, generisanog u sistemu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /peroksidaza i poređenje sa Troloksom; praćenje: spektrofotometrijski (Sánchez-Moreno, 2002)
Određivanje redoks potencijala	FRAP test ( <i>ferric ion reducing antioxidant power</i> ): merenje procenta inhibicije redukcije Fe <sup>3+</sup> tripiridiltriazin (Fe <sup>3+</sup> -TPTZ) kompleksa do Fe <sup>2+</sup> -TPTZ; praćenje: spektrofotometrijski (MacDonald-Wicks <i>i sar.</i> , 2006)
Inhibicija lipidne peroksidacije	<i>Lipidna peroksidacija</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• praćenje formiranja primarnih produkata oksidacije hidroperoksida; praćenje: spektrofotometrijski (Laguerre <i>i sar.</i>, 2007)</li> <li>• praćenje formiranja sekundarnih produkata oksidacije malonildialdehida; praćenje: spektrofotometrijski, visokopritisnom hromatografijom, gasnom hromatografijom sa plamenojonizujućim detektorom (Laguerre <i>i sar.</i>, 2007)</li> </ul>

Brz, jednostavan i jeftin način za merenje antioksidativnog kapaciteta je upotreba 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. DPPH<sup>•</sup> se veoma često koristi da se ispita sposobnost supstance da deluje kao hvatač slobodnih radikala ili donor vodonika. DPPH<sup>•</sup> je stabilan organski radikal tamno ljubičaste boje i dostupan je komercijalno (Prior *i sar.*, 2005). U radikalskoj formi DPPH<sup>•</sup> ima apsorpcioni maksimum na 515 nm zahvaljujući nesparenom elektronu, a nakon redukcije apsorpcioni pik nestaje. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH<sup>•</sup> prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik (Slika 27).

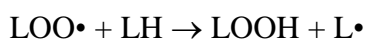


Slika 27. Radikalska i redukovana forma DPPH (Lesjak, 2011)

Najčešće se DPPH radikalski test izvodi spektrofotometrijski, ali postoje i varijacije ove metode, primenom HPLC, kada se DPPH radikalski test izvodi u bojenim sistemima gde pigmenti ometaju spektrofotometrijsko određivanje (Schreiber, 2012). Ova metoda se koristi i u složenim biološkim sistemima, može se primenjivati podjednako za čvrste, kao i tečne uzorke i nije specifična metoda za analizu aktivnosti određene komponente, već daje rezultate ukupne aktivnosti analiziranog uzorka. Antioksidativna aktivnost se izražava na različite načine, kao procenat neutralisanog reagensa, brzina inhibicije oksidacije ili u odnosu na određeni standard kao što je (S)-(-)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina ili Troloks. Nedostatak metode određivanja antioksidativne aktivnosti upotrebom DPPH radikalskog testa je u tome što se stabilni DPPH<sup>•</sup> radikal značajno razlikuje od peroksil radikala koji učestvuju u lipidnoj oksidaciji u realnim sistemima, tj. u hrani (Prior *i sar.*, 2005).

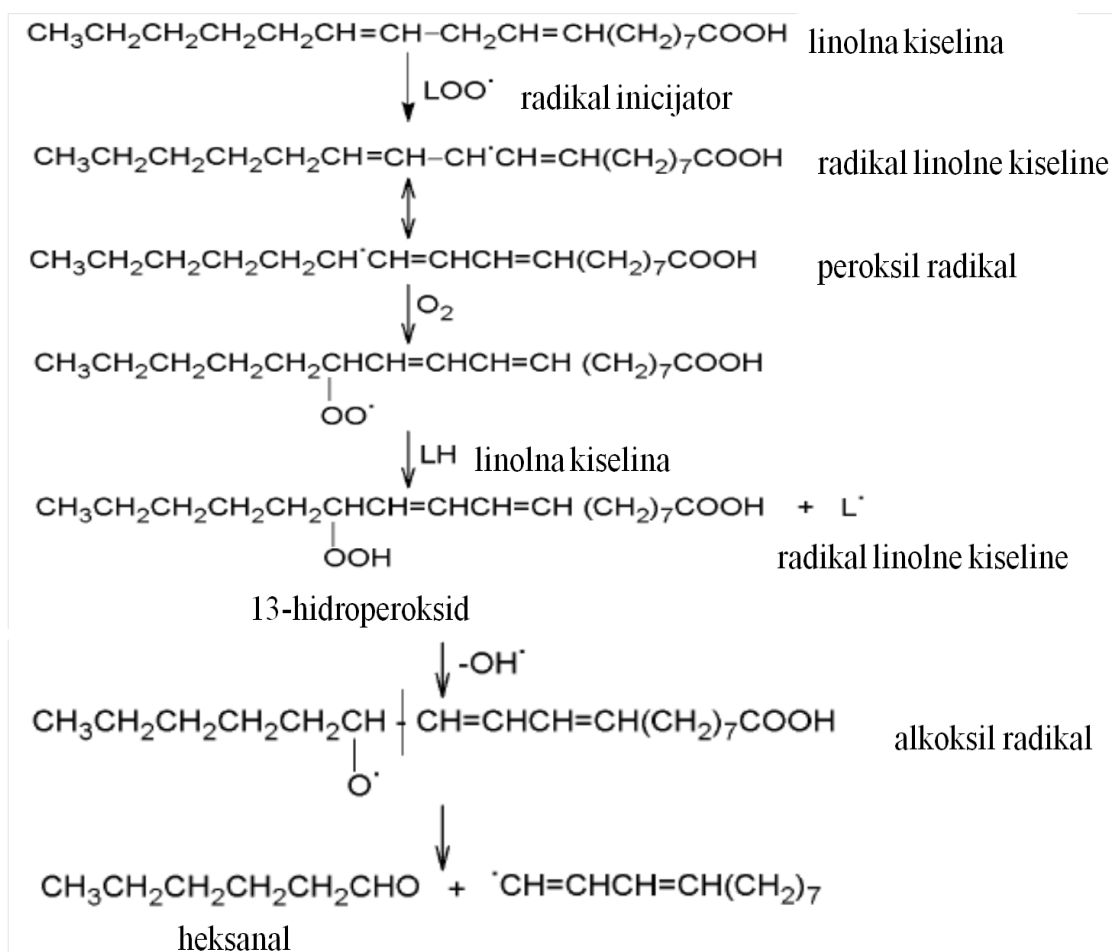
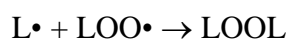
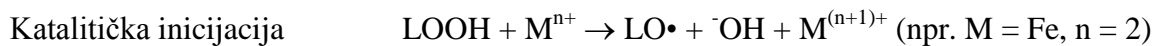
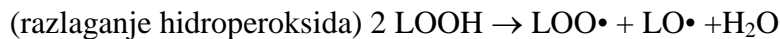
### 2.6.5.2. Lipidna peroksidacija u hrani

Lipidna peroksidacija je proces kojem podležu lipidi u hrani. Mehanizam lipidne peroksidacije podrazumeva nastajanje lipidnih peroksida napadom slobodnih radikala na lipide. Osnovni supstrat za oksidativno oštećenje lipida predstavljaju polinezasićene masne kiseline (Polyunsaturated Fatty Acids - PUFA) u fosfolipidima i glikolipidima, kao i holesterol u biološkim membranama. Polinezasićene masne kiseline, kao što su oleinska, linolna i linolenska sadrže najmanje dve dvostruke veze između kojih se nalazi metilenska grupa koja sadrži posebno reaktivne vodonikove atome. Lipidna peroksidacija se u biološkim sistemima može odigrati enzimskim (pod dejstvom lipooksigenaza) i neenzimskim putem. Ukoliko se oksidacija odvija u prisustvu atmosferskog kiseonika, naziva se autooksidacija. Brzina oksidacije PUFA raste sa povećanjem nezasićenosti. Opšti mehanizam lipidne peroksidacije sastoji se od tri faze: (1) inicijacije, formiranja slobodnih radikala; (2) propagacije, lančanih reakcija sa slobodnim radikalima; i (3) terminacije, formiranje neradikalnog proizvoda. Mehanizam lipidne peroksidacije je prikazan šematski. Inicijacija započinje oduzimanjem vodonikovog atoma iz biomolekula. Masna kiselina (LH) se u fazi inicijacije prevodi u radikal masne kiseline ( $L\cdot$ ). Inicijatori su reaktivne kiseonične vrste (*Reactive Oxygen Species* - ROS), kao na primer hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ), peroksil radikal ( $ROO\cdot$ ) i alkoksil radikal ( $RO\cdot$ ) koji imaju sposobnost da oksidišu polinezasićene masne kiseline. Radikal masne kiseline nije stabilan molekul, tako da automatski reaguje sa molekulskim kiseonikom, na taj način stvarajući peroksil radikal masne kiseline ( $LOO\cdot$ ). Ovaj radikal reaguje sa drugim molekulom masne kiseline i nastaje ponovo radikal masne kiseline i lipidni hidroperoksid ( $LOOH$ ), jedan od glavnih početnih proizvoda lipidne peroksidacije koji se raspada i formira jedinjenja koja su odgovorna za užeglost namirnica. Takvi sekundarni proizvodi uključuju zasićene i nezasićene aldehide, ketone, alkohole i kiseline. Lančana reakcija se zaustavlja kada dva radikala reaguju i daju neradikalni molekul. Ovo se događa jedino ako je koncentracija radikala dovoljno velika da bi došlo do sudara dva radikala. Lančanu reakciju mogu prekinuti antioksidansi tako što deluju kao "hvatači" ("skevindžeri") slobodnih radikala. Mehanizam kompleksne lančane reakcije lipidne peroksidacije odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Babović, 2010).



Hidroperoksidi koji se dalje formiraju sposobni su da iniciraju stvaranje novih slobodnih radikala koji dalje učestvuju u lančanim reakcijama. Nastali peroksi radikali su izuzetno reaktivni i napadaju važne biomolekule, proteine, ugljene hidrate i nukleinske kiseline. Tokom ovih složenih hemijskih i biohemijskih reakcija nastaju novi lipid peroksi radikali, a i alkoksi i hidroksi radikali (Halliwell, 1995). Pri normalnim uslovima lipidni peroksidi su stabilni, ali u prisustvu metalnih jona (najčešće jona gvožđa i bakra) podležu

dekompoziciji uz nastanak novih slobodnih peroksi i alkoksi radikala (Šojić, 2013; Babović, 2010):



Slika 28. Formiranje 13-hidroperoksida iz linolne kiseline i nastajanje heksanala iz 13-hidroperoksida (Babović, 2010)

Fermentisane kobasice su proizvodi od mesa koji sadrže visok sadržaj lipida, (20 - 40)%. Lipidi u fermentisanim kobasicama predstavljaju značajan izvor energije, liposolubilnih vitamina i esencijalnih masnih kiselina. Sa druge strane, u toku procesa sušenja i zrenja, dolazi do lipolize, procesa koga prati oslobađanje slobodnih masnih kiselina iz tri, di i monoacilglicerola, koje predstavljaju osnovne supstrate za proces lipidne peroksidacije (Šojić, 2013).

Tok oksidativnih promena je prikazan na konkretnom primeru linolne kiseline uz nastajanje 13-hidroperoksida i zasićenog aldehida heksanala na *Slici 28*.

Metode koje se koriste za određivanje stepena oksidativnih promena na lipidima podeljene su u dve grupe:

1. Određivanje primarnih produkata lipidne peroksidacije (Tabela 4)
2. Određivanje sekundarnih oksidativnih promena na lipidima (Tabela 5)

**Tabela 4. Metode analize primarnih produkata oksidacije (Shahidi i Zhong, 2005)**

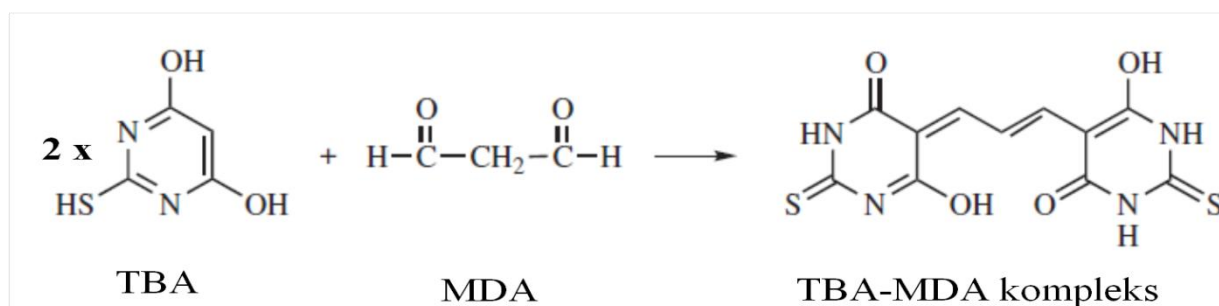
Metoda	Princip	Merenje	Primena
Jodometrijska titracija (peroksidni broj)	Redukcija ROOH pomoću KI i merenje I <sub>2</sub>	Titracija sa Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Masti i ulja
Kompleksi jona gvožđa (peroksidni broj)	Redukcija ROOH pomoću Fe <sup>2+</sup> i formiranje Fe <sup>3+</sup> kompleksa	Apsorpcija na 500 nm-510 nm crvenog kompleksa sa SCN <sup>-</sup>  Apsorpcija na 560 nm plavo-ružičastog kompleksa sa ksilenol oranž	Masti, ulja i lipidi iz hrane  Svi uzorci
FTIR (peroksidni broj)	Redukcija ROOH pomoću TPP	Apsorpcija TPPO na 542 cm <sup>-1</sup>	Masti i ulja
Hemiluminescencija (peroksidni broj)	Reakcija sa luminolom u prisustvu hem katalizatora	Hemiluminescencijska emisija oksidovanog luminola	Masti i ulja
GC-MC (peroksidni broj)	Redukcija ROOH u ROH i kvantifikacija derivata ROH	ROH derivata	Svi uzorci
UV spektrometrija (konjugovani dieni i trieni)	Procena konjugovanih diena i triena	Apsorpcija na 230 nm-234 nm i na 268 nm	Svi uzorci

U ovoj tabeli merenja apsorpcije kiseonika i analiza gubitaka dvostrukih veza u masnim kiselinama nisu smatrane kao primarne promene

**Tabela 5. Metode analize sekundarnih produkata oksidacije (Shahidi i Zhong, 2005)**

Metoda	Princip	Merenje	Primena
TBA	TBA reaktivne supstance, uglavnom malondialdehid	Spektrofotometrijska tehnika, može biti izvršena na celom uzorku	Svi uzorci, a posebno riblja ulja
p-Anizidin	Aldehidi, pretežno alkenali	Apsorpcija na 350 nm, standardna metoda	Masti i ulja
Karbonilna jedinjenja	Ukupna karbonilna jedinjenja ili specifični formirani karbonilni sastojak	Spektrometrijska tehnika i HPLC za određivanje ukupnih i specifičnih karbonilnih jedinjenja	Masti i ulja
OSI metoda (Rancimat i drugi aparati za testiranje oksidativne stabilnosti)	Isparljive organske kiseline	Praćenje promena provodljivosti, brzo i automatizovano	Masti i ulja
Gasna hromatografija	Isparljiva karbonilna jedinjenja i ugljovodonici	Direktna "headspace" brza analiza	Svi uzorci

Određivanje sadržaja malondialdehida pomoću 2-tiobarbitone kiseline (TBA test) je prvi put upotrebljen pre više od 40 godina i danas je najčešće korišćen test za određivanje oksidativnih promena u hrani. Tokom oksidacije lipida, malondialdehid (MDA) nastaje kao rezultat degradacije polinezasićenih masnih kiselina. U ovoj analitičkoj metodi, MDA reaguje sa 2-tiobarbiturnom kiselinom i nastaje MDA-TBA kompleks pink boje, koji se određuje spektrofotometrijski na apsorpcionom maksimumu na (530 – 535) nm (Slika 29). Step en oksidacije se prikazuje kao miligram MDA ekvivalenata po kilogramu uzorka ili kao mikromolovi MDA ekvivalenata po gramu uzorka (Shahidi i Zhong, 2005)

**Slika 29. Formiranje obojenog kompleksa TBA-MDA (Shahidi i Zhong, 2005)**

Kada se tumače rezultati dobijeni ovom metodom, potrebno je imati u vidu da alkenali i alkadienali takođe reaguju sa TBA dajući pink obojenje, pa je podesnije koristiti izraz sadržaj TBA reaktivnih supstanci umesto sadržaja MDA (Shahidi i Zhong, 2005). Zbog jednostavnosti i visoke korelacije sa senzorskom ocenom kvaliteta ova metoda se veoma često primenjuje za definisanja oksidativnog statusa mesa i proizvoda od mesa (Šojić, 2013).

Kako su primarni peroksidi veoma nestabilni, a TBARS metoda pogodna najviše za poređenje uzoraka istog tipa podvrgnutih različitim uslovima, ovu metodu je poželjno dopuniti dodatnim testom. Određivanje sadržaja lako isparljivih aldehida (pentanala, heksanala, oktanala, nonanala) sve više se primenjuje radi kvantifikovanja sekundarnih oksidativnih promena na lipidima (Ross i Smith, 2006).

Postoje brojne analitičke tehnike za izolovanje i kvantifikovanje lako isparljivih komponenata iz hrane, nastalih u toku procesa lipidne peroksidacije. U samom začetku



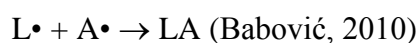
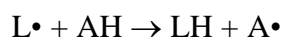
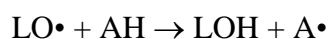
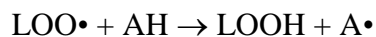
oksidacije, lako isparljive komponente se u hrani nalaze u veoma malim količinama, a hrana, generalno predstavlja veoma složen supstrat, što predstavlja teškoću za njihovo izolovanje i precizno kvantifikovanje. Takođe, mora se voditi računa da u samom postupku pripreme uzorka za analizu ne dođe do dalje oksidacije samog uzorka. Mnogi produkti oksidacije su isparljivi i egzistiraju u gasovitom stanju na temperaturi određivanja, te su za njihovo određivanje pogodne metode gasne hromatografije. Iz navedenih razloga se, pri određivanju lako isparljivih jedinjenja, kao produkata lipidne peroksidacije, u mesu i proizvodima od mesa najčešće koriste metode gasno-hromatografske (GC) analize, kao što su statička i dinamička „headspace“ (HS) tehnika i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (Solid Phase Microextracion, SPME) (Ross i Smith, 2006).

Statička „headspace“ tehnika (SHS) je metoda koja omogućava brzo, lako i pouzdano određivanje lako isparljivih jedinjenja. Za analizu je potrebna mala količina uzorka, a u toku same analize redukovano je formiranje sporednih, isparljivih produkata. Nedostatak ove tehnike je mala osetljivost. Količina izdvojenih komponenata iz uzorka zavisi od više faktora, kao što su: vrsta i koncentracija uzorka, isparljivost komponenata, vreme i temperatura inkubacije (Ross i Smith., 2006; Mandić *i sar.*, 2012; Šojić, 2013).

Za razliku od statičke „headspace“ tehnike, dinamička „headspace“ tehnika sprečava uspostavljanje ravnoteže između matriksa i lako isparljivih jedinjenja. U ovoj tehnici pročistiti-uloviti (eng. *purge and trap*) inertni gas u kontinuitetu nosi uzorak (*purge*), što omogućava izdvajanje isparljivih jedinjenja iz uzorka. Gas sa uzorkom prolazi kroz „zamku“ koja zadržava isparljive analite izdvojene iz uzorka. Ova tehnika je osetljivija u odnosu na statičku „headspace“ tehniku, ali i zahteva instrumentaciju, kao i duže vreme analize uzorka (Ross i Smith, 2006).

### 2.6.5.3. Antioksidativna aktivnost hitozana

Primarni antioksidansi (AH) deluju kao "hvatači" ("skevindžeri") slobodnih radikala ( $\text{LOO}\cdot$ ,  $\text{LO}\cdot$  i  $\text{L}\cdot$ ) prekidajući lančanu reakciju u fazi propagacije, redukujući slobodan radikal i formirajući radikal antioksidansa ( $\text{A}\cdot$ ) koji može reagovati mnogo brže sa molekulom slobodnog radikala od nezasićene masne kiseline ( $\text{LOOH}$ ).



U literaturi se sreću različiti podaci vezani za aktivnost hitozana kao primarnog antioksidansa. Tomida *i sar.* (2009) su prikazali rezultate analize antioksidativne aktivnosti hitozana različitih molekulskih masa (2.8 kDa, 17.0 kDa, 33.5 kDa, 62.6 kDa, 87.7 kDa, 604 kDa, 931 kDa; >90% DD) koncentracije od 1 mg/mL do 8 mg/mL. Njihovi zaključci su da hitozan male molekulske mase (<30 kDa) ima izraženu antioksidativnu aktivnost, merenu kao sposobnost hvatanja  $\text{DPPH}\cdot$  i  $\text{ABTS}^+\cdot$  radikala, kao i sposobnost da redukuje jone bakra. Hitozani veće molekulske mase su bili daleko manje aktivni u navedenim testovima (u koncentraciji do 5 mg/mL), pa su hitozani srednjih vrednosti molekulskih masa pokazali skromnu aktivnost, a hitozani visokih molekulskih masa minimalnu. Na osnovu ovih rezultata, hitozani niskih molekulskih masa bi se mogli smatrati primarnim antioksidansima, što nije slučaj sa visokomolekularnim oblicima. Ovi rezultati su u saglasnosti sa Yasufuku *i sar.* (2010) i Xing *i sar.* (2005). Za hitozan visoke molekulske mase (100 kDa, 90%DD) je pokazano da ima antioksidativni potencijal u sistemskejoj cirkulaciji kod ljudi. Autori pretpostavljaju da visokomolekularni hitozan smanjuje nivo prooksidanata (lipidne hidroperokside i druge prooksidanse koji indukuju nastanak slobodnih radikala) inhibirajući oksidativni stres (Anraku *i sar.*, 2011). Ovo je princip delovanja sinergista u zaštiti supstrata od oksidacije. Analizirajući antioksidativnu aktivnost hitozana, stepena deacetilovanosti (78 - 82)%, bez naznake molekulske mase korišćenog hitozana, Kanatt *i sar.* (2008) su predstavili rezultate u kojima hitozan nije pokazao primarnu antioksidativnu aktivnost ( $\text{DPPH}\cdot$  test, sposobnost hvatanja hidroksil radikala i superoksid anjon radikala, redukciona moć). Visokomolekularni hitozan nije pokazao aktivnost kao primarni antioksidans ni u radovima Pasanphan *i sar.* (2010) i Aleksandrova *i sar.* (1999) i ovaj nedostatak aktivnosti se može dovesti u vezu sa snažnim intra i intermolekularnim vodoničnim vezama, te nedostatku H-atoma koji bi bio doniran u cilju prekidanja lanca oksidacije slobodnim radikalima. Schreiber (2012) je izneo tezu da hitozan nije primarni antioksidans, a da je eventualna aktivnost koja je prikazana u nekim radovima posledica nedovoljne prečišćenosti hitozana i zaostatku nekih komponenti koje mogu pokazati aktivnost.

Drugačiji rezultati su prikazani u radu Wan *i sar.* (2013) gde je, između ostalog, ispitivana aktivnost visokomolekularnog hitozana (1240 kDa, 97% DD) u hvatanju DPPH• radikala, hidroksil radikala i superoksid anjon radikala. Hitozan koncentracije 0.8 mg/mL je pokazao aktivnost različitog intenziteta prema različitim radikalima:  $\bullet\text{O}_2^- > \bullet\text{OH} > \text{DPPH}\bullet$ . Aktivnost u hvatanju DPPH• je bila srednjeg intenziteta (35% AA) i nije zavisila od koncentracije hitozana do 0.8mg/mL. Na osnovu rezultata da su N-kvaternizovani derivati hitozana pokazali veću aktivnost prema DPPH•, a O-kvaternizovani derivati nižu aktivnost u odnosu na nederivatizovani hitozan, autori daju hipotezu da je u hvatanju DPPH• značajniji uticaj hidroksilnih grupa u odnosu na amino grupe. U okviru iste grupe derivata, autori su приметили opadanje aktivnosti sa porastom molekulske mase, što su tumačili većim brojem vodoničnih intramolekularnih veza koje slabe aktivnost hidroksilnih i amino grupa. Antioksidativna aktivnost visokomolekularnog hitozana izražena kao sposobnost hvatanja •OH je rasla sa porastom koncentracije hitozana od 0.11 mg/mL do 1.1 mg/mL i, nešto manje, sa vremenom. U navedenom opsegu koncentracija, procenat aktivnosti je iznosio (12 – 83)%. Predložena su tri mehanizma u hvatanju •OH molekulom hitozana. Prema prvom mehanizmu, hidroksilne grupe polisaharida reaguju sa •OH tipičnom reakcijom apstrakcije (oduzimanja H-atoma). Drugi mehanizam podrazumeva reakciju •OH sa slobodnim amino grupama ( $-\text{NH}_2$ ) pri čemu nastaju stabilni makromolekularni radikali, dok prema trećem mehanizmu amino grupa prelazi u amonijum grupu apsorbujući vodonikov jon iz rastvora i nakon toga amonijum grupa reaguje sa •OH reakcijom adicije. Na osnovu sva tri mehanizma, što je veći broj hidroksil i amino grupa, veća će biti aktivnost antioksidansa. Autori su analizom aktivnosti različitih derivata hitozana izneli da je aktivnost C-2 amino grupe značajnija od aktivnosti C-6 hidroksilne grupe u hvatanju •OH. Aktivnost visokomolekularnog hitozana u hvatanju  $\bullet\text{O}_2^-$  je minimalno zavisila od koncentracije u opsegu 0.4 mg/mL do 2.4 mg/mL i iznosila je od oko (90 - 96.5)%. Polisaharidi koji pokazuju sposobnost hvatanja  $\bullet\text{O}_2^-$  imaju jednu ili više alkoholnih ili fenolnih hidroksilnih grupa, a aktivnost je povezana sa brojem aktivnih hidroksilnih grupa. Takođe, amino grupa može reagovati sa slobodnim radikalom pri čemu nastaje stabilniji makroradikal. Na osnovu rezultata ovog istraživanja, hitozan velike molekulske mase se ponaša kao primarni antioksidans. U prilog primarnoj antioksidativnoj aktivnosti hitozana većih molekulskih masa govore i rezultati Li *i sar.* (2014) koji su ispitivali sposobnost hitozana (78 kDa, 400 kDa, 640 kDa; 97%DD) da hvata •OH. Autori su utvrdili da hitozani svih molekulskih masa imaju antioksidativnu aktivnost od preko 70%, pri čemu ova aktivnost zavisi od koncentracije, vremena i molekulske mase. Kao što je već opisano, zbog mehanizama delovanja, sa povećanjem koncentracije raste aktivnost hitozana. Međutim, sa porastom koncentracije raste i viskozitet rastvora što vodi lošijoj disperziji i smanjenju aktivnosti. Osnovne vodonične veze: intramolekularne, O3–O5 i intermolekularne, N2–O6, pojačavaju se sa povećanjem koncentracije, zbog čega slabi moć hvatanja slobodnih radikala, pa postoji optimalna koncentracija koja je ovde ustanovljena kao 0.2 mg/mL. Sa povećanjem molekulske mase raste intenzitet intramolekularnih vodoničnih veza i ponovo dolazi do smanjenja aktivnosti. U radu Yen *i sar* (2008), potvrđena je primarna antioksidativna aktivnost hitozana različitih stepena deacetilovanosti (83.3 - 88.4)%, ali se u radu ne navode molekulske mase analiziranih hitozana. U opsegu koncentracija (0.1 – 10) mg/mL, hitozan je pokazao značajnu aktivnost u hvatanju hidroksilnog radikala, i to (60 - 80)% u koncentraciji 0.1 mg/mL i (88.7 – 94.1)% u koncentraciji 10 mg/mL (aktivnost raste sa porastom stepena

deacetilovanosti). Takođe, testom konjugovanih diena, svi hitozani su pokazali antioksidativnu aktivnost u zaštiti linolne kiseline od oksidacije, koja je bila uporediva sa aktivnošću askorbinske kiseline. U koncentraciji 1 mg/mL, aktivnost se kretala od (58.3 – 70.2)%, dok je pri koncentraciji 10 mg/mL aktivnost bila (79.9 – 85.2)%. Aktivnost u hvatanju DPPH• radikala je bila skromna i iznosila maksimalno 50% pri najvišoj koncentraciji hitozana. Posebno nisku aktivnost u hvatanju ovog radikala je pokazao hitozan sa najnižim stepenom deacetilovanosti. Sposobnost heliranja fero jona svih hitozana je bila izrazito visoka (slično EDTA) i iznosila (82.9 – 96.5)% pri koncentraciji hitozana 1 mg/mL. Sposobnost heliranja jona prelaznih metala je od velike važnosti za primenu hitozana u zaštiti hrane od lipidne peroksidacije. Mehanizam heliranja kod hitozana se zasniva na vezivanju jona za hidroksilnu grupu na C6 atomu i amino grupu na C2 atomu. Redukujuća moć analiziranih hitozana je bila niska i iznosila oko trećine vrednosti redukujuće moći koju su pokazali  $\alpha$ -tokoferol, BHA i askorbinska kiselina (Yen 2008). Veoma slične rezultate, gde je pokazano da hitozan ima solidnu aktivnost u hvatanju slobodnih radikala, koja zavisi od koncentracije i stepena deacetilovanosti su prikazali Park *i sar.* (2004) za heterohitozane molekulskih masa  $1.4 \cdot 10^5$ - $3.1 \cdot 10^5$  i stepena deacetilovanosti oko 50%, oko 75% i oko 90%. Aktivnost u hvatanju DPPH• radikala i hidroksil radikala je približna rezultatima u prethodnom istraživanju, dok su u koncentraciji 5 mg/mL hitozani pokazali aktivnost u hvatanju alkil radikala (43.01 - 68.41)%, a u hvatanju superoksid anjon radikala rastvor hitozana 0.5 mg/mL je imao aktivnost (46.53 -53.24)%.

Kada je u pitanju antioksidativna aktivnost hitozanskih filmova, u literaturi su prikazani rezultati za sposobnost hvatanja DPPH• radikala, ABTS<sup>+</sup>• radikala, redukujuću moć i sposobnost heliranja jona prelaznih metala. Najčešće se analizira vodeni ili metanolni ekstrakt filma, tako da u kontakt sa slobodnim radikalima, odnosno jonima u ovim testovima ne dolazi čitav film, već samo deo komponenata filma koji može da migrira u vodu ili metanol. Ovo je najverovatnije niskomolekularna frakcija glukoamina, sirćetna kiselina i nečistoće u sastavu hitozana (Lagaron *i sar.*, 2007; Schreiber, 2012). Rezultati testova pokazuju da hitozanski film nema aktivnost ili ima minimalnu aktivnost, mereno sposobnošću hvatanja DPPH• radikala i redukcione moći, dok je konstatovana određena sposobnost u heliranju fero jona (oko 20%). Pronađene su dve reference u kojima je analizirana aktivnost filma na bazi hitozana direktno u kontaktu sa rastvorom DPPH• radikala, i ABTS<sup>+</sup>• anjon radikala i u ovim testovima je konstatovana niska aktivnost ili aktivnost nije registrovana (Tabela 6). Ovakav rezultat se može tumačiti jakim intermolekularnim vodoničnim vezama o kojima je već bilo reči u koncentrisanim rastvorima hitozana, koje su u filmu još više izražene, a koje angažuju reaktivne grupe hitozana ne ostavljajući mogućnost ispoljavanja antioksidativnog potencijala filma. Da bi se unapredila antioksidativna aktivnost hitozanskog filma, autori modifikuju molekul hitozana uvodeći grupe sa primarnom antioksidativnom aktivnošću (Schreiber, 2012) ili dodaju različite primarne niskomolekularne antioksidanse u sam film (Tabela 6). U drugom slučaju film služi kao nosač ovih komponenti i omogućava njihovo postepeno otpuštanje tokom vremena. Neke od aktivnih komponenti koje su dodavane u hitozanski film, kao i doprinos antioksidativnoj aktivnosti ovih komponenti hitozanskom filmu su prikazani u *Tabeli 6*.

**Tabela 6. Radovi u kojima je dodatkom aktivne supstance poboljšana antioksidativna aktivnost hitozanskog filma**

Film	Test	Aktivnost	Referenca
<p>Baza filma: Hitozan 95%DD, 1.5% (w/v) u 1% mlečnoj kiselini</p> <p>Aktivna komponenta: <math>\alpha</math> tokoferol: 0.1% i 0.2%</p>	DPPH• metanolnog ekstrakta filma, merena aktivnost (%)	10.69 ± 1.00  97.42 ± 0.71 97.71 ± 0.22	Martins <i>i sar.</i> (2012)
<p>Baza filma: Hitozan 165 kDa, 85%DD, 2% (w/v) u 1% sirćetnoj kiselini</p> <p>Aktivna komponenta: 5-hidroksi-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil) hept-4-en-3-on (THC1) 0.02% 5- hidroksi-1,7-bis(4- hidroksi - 3,5-dimetoksifenil) hept-4-en-3-on (THC2): 0.02%</p>	DPPH• filma, merena inicijalna brzina potrošnje DPPH• (mol/min)	bez aktivnosti  (0.31 ± 0.03)10 <sup>-6</sup>  (0.16 ± 0.02) 10 <sup>-6</sup>	Portes <i>i sar.</i> (2009)
<p>Baza filma: Hitozan velike molekulske mase, 75-85%DD, 2% (w/v) u 1% mlečnoj kiselini</p> <p>Aktivna komponenta: Etarsko ulje <i>T. moroderi</i> 0.5%, 1%, 2%  Etarsko ulje <i>T. piperella</i> 0.5%, 1%, i 2%</p>	1. DPPH• 2. FRAP metanolnog ekstrakta filma, merena aktivnost (mg Troloks ekvivalenata (TE)/g film) 3. Fe <sup>2+</sup> heliranje (%)	1. 0.003 ± 0.00 2. 0.21 ± 0.00 3. oko 20%  1. 0.42 - 0.63 2. 0.00 - 0.67 3. oko 35%  1. 0.69 - 1.09 2. 2.79 - 10.09 3. oko 35%	Ruiz-Navajas <i>i sar.</i> , 2013
<p>Baza filma: Hitozan 450 kDa, 75-85%DD, 2% (w/v) u 1% sirćetnoj kiselini</p> <p>Aktivna komponenta: Etarsko ulje <i>Z. multiflora Boiss</i> (ZEO) i ekstrakt semenki grožđa (GSE): 5 g/L ZEO, 10 g/L ZEO, 10 g/L GSE, 10 g/L GSE+5 g/L ZEO, 10 g/L GS E+10 g/L ZEO</p>	1. DPPH• 2. redukujuća moć vodenog ekstrakta filma, merena aktivnost (%)	1. 12% 2. Bez aktivnosti  1. 39% za 10 g/L GSE i 54% za 10 g/L GSE+10 g/L ZEO 2. 1 za 10 g/L GSE, 2 za 10 g/L GSE + 5 g/L ZEO, 2 za 10 g/L GSE + 10 g/L ZEO	Moradi <i>i sar.</i> (2012)
<p>Baza filma: Hitozan 80%-95%DD, 1% (w/v) u 1% sirćetnoj kiselini</p> <p>Aktivna komponenta: polifenoli čaja: 0.1% i 0.2% 0.3%</p>	DPPH• vodenog ekstrakta filma, merena aktivnost (%)	oko 5%  oko 40% oko 60% oko 60%	Wang <i>i sar.</i> (2013)

	0.4%		oko 60%	
Baza filma: Hitozan 186 kDa, >90%DD, 1% (w/v) u 1% sirćetnoj kiselini		DPPH• vodenog ekstrakta filma, merena aktivnost (%)	Bez aktivnosti	Kanatt <i>i sar.</i> (2012)
Aktivna komponenta: Ekstrakt mente:	0.1%		20-85%	
Ekstrakt kore nara	0.1%		10-50%	
Baza filma: Hitozan 95%DD, 2% (w/v) u 1% sirćetnoj kiselini		DPPH• vodenog ekstrakta filma, merena aktivnost (%)	<5%	Siripatrawan i Noipha (2012)
Aktivna komponenta: Ekstrakt zelenog čaja 2%, 5%, 10%, 20% (w/v)			(30 – 50)%	
Baza filma: Hitozan male molekulske mase, oko 85%DD, 2% (w/v) u 2% sirćetnoj kiselini		ABTS <sup>+</sup> • filma, relativna apsorbancu rastvora ABTS <sup>+</sup> •	0.1	Altiok <i>i sar.</i> (2010)
Aktivna komponenta: Etarsko ulje <i>T.vulgaris</i> 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1%, 1.2% (v/v)			0.1 - 0.8	
Baza filma: Hitozan srednje molekulske mase, 85%DD, 1.5% (w/v) u 5% sirćetnoj kiselini		1. ABTS <sup>+</sup> • (%) 2. DPPH• (%) 3. FRAP (Apsorbancu na 595 nm 4. redukujuća moć (Apsorbancu na 700 nm) filma,	1. 13% 2. oko 7% 3. oko 0.12 4. oko 0.55	Ferreira <i>i sar.</i> (2014)
Aktivna komponenta: Vodeni ekstrakt kljuge grožđa 0.15% (w/w) Vosak sa pokožice grožđa 0.15% i 0.30% (w/w) Ulje semenki grožđa 0.75% (w/w)			1. (13 – 30)% 2. (15 – 35)% 3. 0 - 0.22 4. 0.4 - 0.6	

Autooksidacija predstavlja osnovni proces oksidacije lipida u fermentisanim kobasicama, kao i u ostalim animalnim proizvodima (Gandemer, 2002; Min i Ahn, 2005). Lipidna peroksidacija se ubrzava porastom temperature, delovanjem svetlosti (naročito kratkih talasnih dužina), katalizatora, tragova metala (posebno gvožđa i bakra) i pigmenata. Nasuprot promotornim postoje i inhibicioni faktori oksidacije. Odstranjivanje kiseonika najvažniji je faktor inhibicije. Inaktivacija oksidacionih enzima, zaštita od svetlosti i odstranjivanje metalnih jona su takođe važni faktori, ali njihova kontrola često nije primenjiva u aktuelnim sistemima (Stojimenović, 1997; Šojić, 2013).

Kada je hitozan različitih molekulskih masa dodat uzorku samlevene ribe som u tri koncentracije, nakon čega je riba skladištena na 4°C, pokazano je da aktivnost hitozana zavisi od oba navedena faktora, molekulske mase i koncentracije. Maksimalna aktivnost niskomolekularnog hitozana (30 kDa) od 75% smanjenja nastalih TBARS je utvrđena nakon 7 dana skladištenja, pri koncentraciji hitozana od 0.2%. Za srednjemolekularni hitozan (90 kDa), maksimalna aktivnost je bila 50% nakon 7 dana pri koncentraciji 1%, a za visokomolekularni hitozan 69% nakon 7 dana pri koncentraciji 1%. Autori su aktivnost doveli u vezu sa helirajućom moći molekula hitozana za jone prelaznih metala koji deluju kao prooksidanti (Kim i Thomas, 2007). Sličan eksperiment je izveden sa mlevenom kivanom haringom i bakalarom kojima je dodata različita koncentracija (50 ppm, 100 ppm i 200 ppm)

hitozana različitog viskoziteta (14 cP, 57 cP, 360 cP). Sa povećanjem koncentracije i smanjenjem viskoziteta, rasla je antioksidativna aktivnost, merena peroksidnim brojem, sadržajem TRARS, propanala i ukupnih isparljivih jedinjenja. Maksimalna vrednost inhibicije oksidativnih promena izmerena je za najveću koncentraciju (200 ppm) hitozana najmanjeg viskoziteta (14 cP), mada je u svim koncentracijama hitozan sva tri viskoziteta pokazao antioksidativnu aktivnost, koju su autori obrazložili kao posledicu sposobnosti heliranja i redukcije jona gvožđa prvenstveno, a donekle i sposobnosti hvatanja slobodnih radikala (Kamil *i sar.*, 2002; Shahidi *i sar.*, 2002). Dodatak hitozana svežoj svinjskoj kobasici u koncentraciji 1%, doveo je do smanjenja peroksidnog broja i sadržaja TBARS tokom skladištenja na 4°C koji je bio uporediv sa efektom ekstrakta ruzmarina, a veći nego efekat  $\alpha$ -tokoferola (Georgantelis *i sar.*, 2007). U radu gde je mlevenoj junetini dodato 1% (w/w) niskomolekularnog hitozana, stepena deacetilovanosti (75 – 85)%, pre pakovanja u vakuumu, različitoj modifikovanoj atmosferi (80% O<sub>2</sub>+20% CO<sub>2</sub>, 0.4% CO+19.6% CO<sub>2</sub>+80% N<sub>2</sub>), ili aerobno i skladištenja na 1°C, uočena je antioksidativna aktivnost hitozana u svim pakovanjima (Suman *i sar.*, 2010). U drugom radu su, praćenjem promena parametara kvaliteta tokom skladištenja fino usitnjene barene kobasice od svinjskog mesa u vakuumu i vazduhu tokom 3 nedelje na 4°C sa i bez dodatka hitozanskih oligomera (molekulske mase 5000), dobijeni rezultati koji ukazuju na izraženo antioksidativno dejstvo hitozana tokom skladištenja u vazduhu, dok se rezultati nakon skladištenja u vakuumu nisu značajno razlikovali kod kobasice sa i bez dodatka hitozana (Jo *i sar.*, 2001). Slično, dodatak hitozana različitih molekulskih masa kineskoj kobasici pakovanoj u vakuumu, doveo je do smanjenja sadržaja konjugovanih diena u kobasici tokom skladištenja, dok sadržaj TBARS nije promenjen ni u kobasici bez hitozana, tokom skladištenja od sedam nedelja. Kao i u prethodnim radovima, autori su aktivnost hitozana objasnili helirajućom sposobnosti hitozana (Lin i Chao, 2001). Isti mehanizam antioksidativne aktivnosti hitozana su naveli i autori koji su uočili značajnu inhibiciju oksidacije lipida u fermentisanoj Grčkoj kobasici nakon dodatka 0.5% i 1% hitozana (MW:  $4.9 \cdot 10^5$ , 88.2% DD) (Soultos *i sar.*, 2008).

Za razliku od eksperimenata u kojima je hitozan primenjen u funkciji antioksidansa koji je dodavan kao aditiv u masu proizvoda, hitozan je ispitivan i kao omotač za proizvode na bazi ribe i mesa. U radu koji je ispitivao uticaj omotača na bazi hitozana različitog viskoziteta (14 cP, 57 cP, 360 cP) na inhibiciju oksidacije u filetima ribe haringe i bakalara, pokazano je da svi primenjeni omotači inhibiraju oksidaciju, mereno vrednostima peroksidnog broja, sadržaja konjugovanih diena, TBARS, propanala i ukupnih isparljivih aldehida, ali da je hitozan najvećeg viskoziteta dao najbolji rezultat. Grilovani odresci svinjskog mesa koji su pre pakovanja u vakuumu uranjani u rastvor hitozana 2% i 2.5% (w/v) su pokazali dužu održivost, na osnovu senzorske ocene, kao i manji stepen oksidacije, mereno peroksidnim brojem u odnosu na kontrolne uzorke upakovane u vakuumu bez hitozanskog premaza. Autori doprinose hitozanskog premaza u inhibiciji oksidacije objašnjavaju dobrim barijernim svojstvima filma za kiseonik (Yingyuad *i sar.*, 2006). Fileti sardine, koji su uranjani u rastvor hitozana (>80% DD) koncentracije 1% (w/v) i 2% (w/v), pre skladištenja na temperaturi 1 °C do 2 °C su pokazali niži stepen oksidacije tokom čitavog skladištenja, mereno sadržajem TBARS. Autori su ovaj efekat objasnili kao kombinaciju većeg broja faktora: barijernih svojstava hitozanskog filma za kiseonik i pojave da primarne amino grupe

hitozana formiraju stabilnu fluorosferu sa isparljivim aldehydima kao što je malondialdehid (Weist i Karel, 1992; Mohan *i sar.*, 2012), sposobnosti hvatanja slobodnih radikala od strane hitozana velikog stepena deacetilovanosti (Park *i sar.*, 2004), kao i sposobnost hitozana da helira metalne jone (Mohan *i sar.*, 2012). Hitozanski premaz ( $1.6 \cdot 10^5$ , 85% DD) 2% (w/v) je, takođe, značajno umanjio intenzitet lipidne oksidacije ribe tolstolobik skladištene na 3°C tokom 30 dana (Fan *i sar.*, 2009). Primena hitozanskih filmova za filete soma, takođe je dovela do redukcije lipidne oksidacije. Mehanizam delovanja se objašnjava prisustvom velikog broja naelektrisanih grupa koji dovode do snažne polimerne interakcije, te nema kretanja lanaca koji oformljavaju dobru barijeru za prolaz kiseonika (Chhabra, 2004). Ima i suprotnih rezultata, gde hitozanski filmovi nisu uticali na TBARS vrednosti kod paštete, moguće zbog narušenog integriteta filma što je dovelo do povećanja propustljivosti kiseonika (Chhabra, 2004). Slično, uranjanjem govedih pljeskavica u rastvor hitozana nije došlo do smanjenja nivoa oksidacije tokom skladištenja na 4 °C. Autori su pretpostavili da je došlo do narušavanja barijernih svojstava hitozanskog omotača za kiseonik, najverovatnije usled bubrenja omotača apsorpcijom vlage sa površine mesa (Wu *i sar.*, 2000). Siripatrawan i Noipa (2012) su analizirali uticaj filma na bazi 2% (w/v) hitozana (100 kDa, 95% DD) i na bazi hitozana sa dodatim ekstraktom zelenog čaja (20%, w/v) na zaštitu barene svinjske kobasice tokom skladištenja na  $4 \pm 1$  °C, tokom 20 dana. Kobasice su bile umotane u zaštitni film, a zatim upakovane u aerobnim uslovima u kesice PA/PE. Primenom filma na bazi hitozana, tokom čitavog perioda skladištenja zabeležen je niži sadržaj TBARS u odnosu na kontrolne uzorke upakovane u aerobnim uslovima u kesice PA/PE bez zaštitnog omotača, a ovaj efekat su autori objasnili kao kombinovani uticaj niske propustljivosti filma za kiseonik i antioksidativne aktivnosti hitozana heliranjem jona gvožđa oslobođenih iz hemoproteina mesa. Inkorporiranjem ekstrakta zelenog čaja, sadržaj TBARS tokom skladištenja je dodatno bio umanjen, a mehanizam je objašnjen kao sposobnost hvatanja slobodnih radikala i heliranja jona prelaznih metala (Siripatrawan i Noipa, 2012). Fileti japanskog brancina uronjeni u 1.5% (w/v) rastvor hitozana (80-95% DD) imali su značajno sporiji rast sadržaja malondialdehida tokom skladištenja od 12 dana na 4 °C, a sa dodatkom ekstrakta korena sladića, rast sadržaja malondialdehida je dodatno usporen. Autori su, slično prethodnim obrazloženjima pretpostavili da aktivnost hitozana potiče od heliranja slobodnih jona gvožđa i vezivanja malondialdehida za slobodne amino grupe hitozana, a da se doprinos ekstrakta sladića zasniva na antioksidativnom efektu fenolnih jedinjenja (Qiu *i sar.*, 2014). Slični rezultati su dobijeni i za pileći ćevap sa premazom na bazi 1.5% (w/v) hitozana niske molekulske mase (75%-85% DD), kao i kada je ovom premazu dodato etarsko ulje timijana (Giatrakou *i sar.*, 2010), za pastrmku sa 2% (w/v) hitozanskim premazom (450 KDa) i hitozanskim premazom sa dodatim uljem cimeta 1.5% (v/v) (Ojagh *i sar.*, 2010), kao i za ribu *Pseudosciaena crocea* sa 1.5% (w/v) premazom na bazi hitozana ( $1.6 \cdot 10^5$ , 85% DD) uz predtretman uranjanja u 0.2% rastvora polifenola zelenog čaja i 0.2% ekstrakta ruzmarina (Li *i sar.*, 2012).

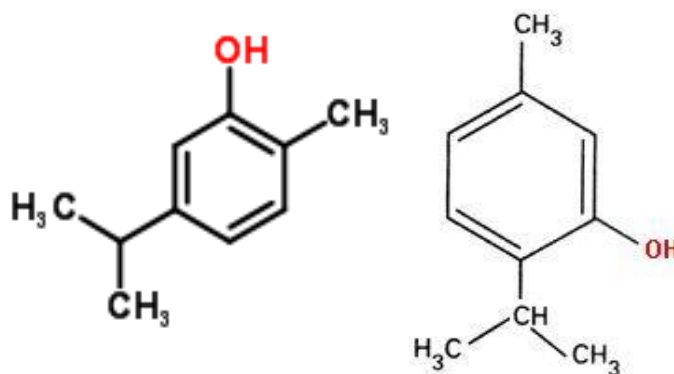
Na osnovu mnogih sprovedenih istraživanja, može se izvući generalni zaključak da se hitozan uspešno može koristiti kao antioksidans, bilo kao dodatak hrani ili kao jestivi film. Pritom je intenzitet delovanja srazmeran upotrebljenoj koncentraciji hitozana, ali se uticaj molekulske mase, i stepena deacetilovanosti hitozana, kao i vlažnost površine proizvoda mora uzeti u obzir.



#### 2.6.5.4. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja biljaka

Često korišćene antioksidativne niskomolekularne komponente u polimernim biofilmovima su etarska ulja biljaka. Etarska ulja su prirodne kompleksne mešavine isparljivih lipofilnih supstanci koje se dobijaju iz različitih delova biljaka destilacijom vodenom parom, ekstrakcijom u rastvaraču ili hladnim ceđenjem i imaju sastav koji varira u zavisnosti od različitih faktora: izvora, lokacije, tehnike uzgajanja, sezonskih promena. Karakteriše ih jak miris, a komponente su im sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka sa kiseonikom u strukturi, kao što su: alkoholi, ketoni, aldehidi i estri koji imaju izraženu bioaktivnost, antibakterijsku, antifungalnu, insekticidnu i antioksidativnu (Bakkali *i sar.*, 2008; Lai *i sar.*, 2007, Madsen i Bertelsen, 1995). Pored toga što su prirodne supstance, specifična prednost primene etarskog ulja je u tome što ulje pokazuje sinergističko delovanje pojedinačnih komponenti koje nadmašuje aktivnost sume pojedinačnih komponenata ulja. Najverovatnije jedinjenja prisutna u malom procentu pojačavaju delovanje osnovnih komponenti (Bakkali *i sar.*, 2008). Zahvaljujući prisustvu hidroksilne grupe u molekulu, najveću antioksidativnu aktivnost imaju fenolna jedinjenja prisutna u etarskim uljima: derivati kofeinske kiseline, flavonoidi i terpenoidi (Madsen i Bertelsen, 1995).

Origano, karakterističan začin mediteranske kuhinje, dobija se sušenjem listova i cvetova biljke *Origanum vulgare*. Tradicionalno, ekstrakt biljke se koristi da poboljša senzorske karakteristike i da produži održivost hrane. Dokazana su antimikrobna i antioksidativna svojstva esencijalnog ulja origana, a karvakrol i timol su prepoznati kao osnovna funkcionalna jedinjenja (Slika 30).



Slika 30: Karvakrol (levo) i timol (desno)

Koncentracija aktivnih komponenti u ulju zavisi od varijeteta biljke, porekla, vremena žetve, uslova obrade i skladištenja. Na primer, origano (*Origanum vulgare*) iz severne Grčke bio je bogat timolom, (30.3 – 42.8)%, a siromašan karvakrolom, (1.7 – 2.5)%, dok je kod biljke iz južne Grčke bilo obrnuto. Sadržaj karvakrola je bio visok, (57.4 – 69.6)%, dok je sadržaj timola bio nizak, (0.2 – 4.1)% (Kokkini *i sar.*, 1997). *Origanum majorana*, uzgajan u jugozapadnom delu mediterana bio je bogat uljima koja su imala visok sadžaj karvakrola, dok je ova biljka uzgajana u zapadnoj Turskoj imala mali sadržaj ulja, a ono je sadržalo karvakrol samo u tragovima (Chi, 2004). Seme kima sadrži oko (2.8 - 5)% etarskog ulja. Osnovne

komponente etarskog ulja kima su keton karvon i terpen limonen. Druge komponente kao trans-dihidrokarvon, cis-dihidrokarvon,  $\beta$ -mircen, karveoli, perila-aldehid su prisutne u niskom procentu (Bailer *i sar.*, 2001). S-karvon (izolovan iz *Mentha spicata*) je pokazao značajnu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa  $\alpha$ -tokoferolom (Elmastaša *i sar.*, 2006). Limonen izolovan iz semena celera je pokazao značajnu antioksidativnu aktivnost između trinaest etarskih ulja testiranih kroz tri različita testa (Wei i Shibamoto, 2007).

Etarsko ulje i različiti ekstrakti, dobijeni iz biljke *Origanum acutidens*, ispitivani su na antioksidativno, antimikrobno i antiviralno dejstvo. Etarsko ulje je pokazalo izražena antimikrobna svojstva u inhibiranju 27 (77%) od 35 bakterijskih vrsta i 12 (67%) od 18 vrsta plesni i kvasaca i skromno antioksidativno dejstvo. GC i GC-MS analize ulja rezultirale su identifikacijom 38 sastojaka, među kojima je osnovni sastojak karvakrol. Ekstrakt, dobijen iz različitih delova biljke, ekstrakcijom metanolom, pokazao je izraženiji antioksidativni efekat (Sökmen *i sar.*, 2004).

Tsimidou i Boskou (1994) su izneli da su, između velikog broja začinskih i drugih biljaka, biljke iz familije *Laminaceae* pokazale najizraženija antioksidativna svojstva. Lagouri *i sar.* (1993) su proučavali antioksidativnu aktivnost etarskih ulja i zaključili da etarsko ulja origana ima značajan antioksidativni efekat u procesu oksidacije životinjske masti. U procesu autooksidacije prečišćenih triacilglicerola iz masti ili iz ulja suncokreta, timol i karvakrol su pokazali značajan zaštitni efekat, pri čemu je izraženiju aktivnost imao timol, u odnosu na karvakrol. Aktivnost timola je bila izraženija u sistemu iz ulja suncokreta, dok za aktivnost karvakrola nije uočena razlika u dva ispitivana sistema. Uzimajući u obzir neisparljive komponente, ekstrakt origana ima najizraženiju antioksidativnu aktivnost među aromatičnim biljkama (Vekari *i sar.*, 1993). Antioksidativna aktivnost alkoholnog ekstrakta origana pretežno potiče od ruzmarinske i kofeinske kiseline. Efekat ovog ekstrakta kao snažnog antioksidansa u stabilizaciji masti pokazali su Baniyas *i sar.* (1992). U radu koji je poredio antioksidativni efekat isparljivih aglikona iz origana, esencijalnog ulja origana, čistog timola, timokvinona i  $\alpha$ -tokoferola (poznat prirodni antioksidans) je pokazano da je, u odsustvu antioksidansa, u slanini došlo do naglog porasta brzine stvaranja hidroperoksida. Isparljivi aglikoni origana i etarsko ulje pokazali su sličan efekat, inhibirajući formiranje hidroperoksida čak 80 dana, dok su čist timol i timokvinon pokazali slabiji antioksidativni efekat. Efekat  $\alpha$ -tokoferola je, po intenzitetu, bio između čistog timola (osnovni sastojak esencijalnog ulja) i timokvinona (osnovna komponenta isparljivih aglikona), sa jedne strane, i isparljivih aglikona i esencijalnog ulja, sa druge strane. Iz svega proizilazi da postoji sinergistički efekat između različitih komponenata koje čine etarsko ulje origana, odnosno isparljive aglikone origana (Milos *i sar.*, 2000). Analizom antioksidativnog delovanja etarskog ulja origana, njegovih frakcija i čistih supstanci primenom tri testa: izbeljivanje  $\beta$ -karotena, DPPH• radikal testa i TBARS testa, dobijeni su rezultati koji govore u prilog izraženoj aktivnosti svih frakcija ulja i samog ulja koja je niža od aktivnosti askorbinske kiseline, ali je u nivou aktivnosti  $\alpha$ -tokoferola i BHT (Kulisic *i sar.*, 2004). U analizi efekta alkoholnih ekstrakata origana i ruzmarina u stabilizaciji sojinog ulja na 63 °C, praćenjem peroksidnog broja, konstatovano je da postoji izražena antioksidativna aktivnost ovih ekstrakata, koja je po intenzitetu jednaka aktivnosti sintetičkih komercijalnih antioksidanasa

BHA i BHT, ali nešto manje izražena u odnosu na aktivnost TBHQ (Akmeida-Doria i Regitano-Dárce, 2000). U radu u kojem je analizirana aktivnost etarskih ulja *O. Vulgare* i *T. capitata* primenom dve metode: analizom sadržaja TBARS kao sekundarnih produkata lipidne oksidacije i brzine stvaranja konjugovanih diena iz linolne kiseline kao primarnih produkata oksidacije (hidroperoksidiena) utvrđeno je da su oba etarska ulja pokazala izraženu antioksidativnu aktivnost, u nivou BHT i veću u odnosu na BHA i  $\alpha$ -tokoferol, ali je aktivnost bila više izražena u redukciji stvaranja primarnih produkata oksidacije (Faleiro *i sar.*, 2005).

Frakcije meksičkog origana različite polarnosti i sastava (fenolna i nefenolna frakcija) su pokazale antioksidativnu ulogu u inhibiciji oksidacije linolne kiseline (Avila-Sosa *i sar.*, 2010).

U radu gde je oko 100 komponenti izolovanih iz etarskih ulja (monoterpeni, ugljovodonici, oksigenovani monoterpeni, seskviterpeni, oksigenovani seskviterpeni, derivati benzena i neizoprenoidne komponente: alkoholi, aldehidi, ketoni) analizirano prema antioksidativnoj aktivnosti primenom TBARS testa, upotrebom žumanca iz jaja i merenjem formiranja hidroperoksidiena iz linolne kiseline u micelarnom sistemu, upotrebom u oba slučaja 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidrohlorida (ABAP) kao inicijatora slobodnih radikala i  $\alpha$ -tokoferola kao referentnu supstancu, maksimalnu aktivnost u oba testa su pokazali timol i karvakrol. Za osnovne komponente ulja kima (*Carum carvi*), s(+) karvon i d(+) limonen antioksidativna aktivnost je bila oko tri puta niža u odnosu na timol u TBARS testu i još niža u testu sa hidroperoksidienima (Ruberto i Baratta, 2000). U radu Kim *i sar.* (2011) analiziran je ukupni sadržaj fenolnih komponenti, ukupni sadržaj flavonoida i sposobnost hvatanja DPPH• i superoksid anjon radikala u vodenom ekstraktu 13 najčešće korišćenih začinskih biljaka u industriji mesa. Sadržaj fenolnih komponenti u origanu je bio u nivou sa bosiljkom i majoranom, dok je u kimu sadržaj fenolnih komponenti bio značajno niži i sličan sadržaju u timijanu, korijanderu, kuminu, komoraču i muskatnom oraščiću. Ukupni sadržaj flavonoida je takođe bio viši u ekstraktu origana (blizak vrednosti za majorana) u odnosu na kim (blizak vrednostima za čubar i komorač). Prema sadržaju fenolnih komponenti, origano je bio na petom mestu, a kim na devetom mestu, dok je prema sadržaju ukupnih flavonoida origano bio na trećem mestu, a kim na osmom od trinaest začinskih biljaka. Prema sposobnosti hvatanja DPPH• radikala, niz ekstrakata začinskih biljaka (1mg/mL) je bio: askorbinska kiselina (referenca) > karanfilić (84.22%) > timijan (70.79%) > ruzmarin (56.98%) > čubar (53.51%) > origano (45.43%) > bosiljak (39.63%) > kumin (35.02%) > kim (30.67%), korijander (30.40%), majoran (30.22%) > kurkuma (24.43%) > muskatni oraščić (20.94%) > komorač (10.48%), u saglasnosti sa sadržajem fenolnih komponenti. Po sposobnosti hvatanja superoksid anjon radikala niz je bio (0.5 mg/mL): majoran > ruzmarin > origano > kumin > čubar > bosiljak > timijan > komorač > korijander > askorbinska kiselina > muskatni oraščić > kurkuma > karanfilić > kim. U trećem testu koji se ticao sposobnosti hvatanja hidroksil radikala, rezultati su bili drugačiji i niz opadajuće aktivnosti ekstrakata (0.5 mg/mL) je bio: kurkuma (68.09%) > muskatni oraščić (60.34%) > askorbinska kiselina (48.72%) > origano (45.75%), komorač (44.63%) > ruzmarin (29.29%) > bosiljak (25.25%) > korijander (21.94%), čubar (20.43%), timijan (19.64%) > karanfilić (10.78%), kim (9.72%), majoran (7.84%) > kumin (2.95%). Zapaža se velika razlika u

antioksidativnoj aktivnosti od metode do metode i ovo je razlog zašto se u analizi antioksidativnih svojstava preporučuje upotreba više različitih testova. Ekstrakt origana je u svim testovima pokazao izraženu antioksidativnu aktivnost, dok je ekstrakt kima pokazao aktivnost srednjeg do slabog intenziteta. Drugačiji rezultati su dobijeni za etarsko ulje kima, gde je  $IC_{50}$  u hvatanju DPPH• radikala iznosila 4.1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a u neutralizaciji vodonikperoksida <2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Najaktivnije komponente u hvatanju DPPH• radikala su bile trans-anetol i monoterpenski alkoholi (karveol i njegovi izomeri). Sa odloženim efektom (1h kasnije) uhvaćena je aktivnost karvona i njegovih izomera. Zaštita od lipidne peroksidacije praćena je TBARS testom u sistemu  $\text{Fe}^{2+}/\text{askorbat}$  i  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  upotrebom lipozoma. Ulje kima je pokazalo snažan antioksidativni efekat u prvom sistemu ( $IC_{50}<2.5 \mu\text{L}/\text{mL}$ ), gde je maksimalna postignuta inhibicija bila 68.11% za koncentraciju ulja 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . U drugom sistemu je efekat bio slabiji i maksimalna postignuta inhibicija za koncentraciju ulja 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  je bila 33.67%. Autori zaključuju da etarsko ulje kima, pored upotrebe kao arome može služiti kao bezbedni antioksidans u zaštiti hrane, pića i farmaceutskih proizvoda (Samojlik *i sar.*, 2010). U analizi antioksidativnih svojstava fenolnog ekstrakta kima, pokazano je da je redukujuća moć ekstrakta slična redukujućoj moći BHA, a viša od moći BHT i da raste sa porastom koncentracije do 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . U opsegu koncentracije (0.1-2)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sposobnost hvatanja DPPH• radikala je rasla od 13.7% do 84.6% i bila izraženija u odnosu na aktivnost BHA i BHT, dok je  $IC_{50}$  fenolnog ekstrakta iznosila 0.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sposobnost hvatanja ABTS<sup>+</sup>• radikala je zavisila od koncentracije i maksimalna vrednost je bila postignuta za 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oko 91%, a maksimalna aktivnost je postignuta za 1 minut. Fenolni ekstrakt kima je bio efikasan u hvatanju superoksid anjon radikala proporcionalno koncentraciji, a  $IC_{50}$  vrednost je bila 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pored ovih testova, merena je i sposobnost fenolnog ekstrakta kima da inhibira lipidnu peroksidaciju linolne kiseline u prisustvu lipoksigenaze iz soje. Inhibicija 50% aktivnosti lipoksigenaze merena sadržajem konjugovanih diena je ostvarena pri 4.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ekstrakta kima, dok je potrebna koncentracija BHA bila 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Blizu 100% inhibicije je ostvareno sa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ekstrakta.

### 2.6.6. Antimikrobna aktivnost hitozana, hitozanskih biofilmova i etarskih ulja biljaka

Rastući zahtevi potrošača za hranom bez hemijskih konzervanasa usmerili su mnoga istraživanja u smeru pronalaženja prirodnih materija koje se mogu koristiti u očuvanju hrane. Prirodni biopolimer hitin, hitozan i njihovi derivati su pokazali izraženu antimikrobnu aktivnost uz niz drugih pozitivnih osobina, te se na izučavanju mogućnosti proširenja opsega primene ovih biopolimera aktivno radi.

Hitozan je nerastvorljiv u vodi, ali rastvorljiv u rastvorima kiselina, pri pH nižoj od 6. Organske kiseline, kao: sirćetna, mlečna i dr. koriste se za rastvaranje hitozana, a najčešće se koristi 1% sirćetna kiselina. Hitozan se u neorganskim kiselinama daleko lošije rastvara: rastvara se u 1% HCl, dok se u sumpornoj i fosfornoj kiselini ne rastvara. Pri pH 7 i višoj, rastvor hitozana je nestabilan, jer dolazi do precipitacije i geliranja (Nadarajah, 2005; Shahidi i Synowiecki, 1991).

Zavisno od supstrata na kojem se primenjuje, hitozan može imati različit mehanizam antimikrobnog delovanja. Na primer, kada se primenjuje za zaštitu biljaka, nanošenjem na rastuće ili ubrane plodove, hitozan aktivira odbrambeni sistem same biljke. Nasuprot ovom mehanizmu, kada se primenjuje u prehrambenim prerađevinama, ili u hranljivim podlogama za mikroorganizme, hitozan deluje direktno na mikrobnu ćeliju, vezuje slobodnu vodu i inaktivira različite enzime. Hitozan deluje i kao gelirajuće sredstvo, a i selektivno vezuje metale u tragovima sprečavajući, na taj način, produkciju toksina i sprečavajući mikrobni rast (Chi, 2004; Shahidi i Synowiecki, 1991). Interakcija između pozitivno naelektrisanog hitozana i negativno naelektrisane ćelijske membrane mikroorganizama može dovesti do različitih efekata, zavisno od vrste i mesta interakcije. Vezivanjem hitozana za membranu mikrobne ćelije može nastati nepropustljiv sloj koji ometa razmenu materija ćelije i okoline, ili pak dolazi do promene propustljivosti membrane, te elektroliti, glukoza, enzimi, ili drugi konstituenti izlaze iz ćelije. Drugi mehanizam predlaže efekat prodiranja hitozana u jedro ćelija mikroorganizama, gde dolazi do vezivanja hitozana za DNK, čime se inhibira sinteza mRNK i proteina. Da bi hitozan mogao prodreti u jedro mora biti male molekulske mase (Chi, 2004; Shahidi i Synowiecki, 1991; Sudharsan *i sar.*, 1992; Papineau *i sar.*, 1991).

Antimikrobna aktivnost hitozana zavisi od velikog broja faktora: fizičkog stanja hitozana (čvrst, rastvoren), supstrata u kojem deluje, jonske jačine, vrednosti pH, sadržaja vlage, koncentracije i molekulske mase hitozana, gustine naelektrisanja (pH sredine, stepen deacetilovanosti), vrste i starosti mikroorganizma.

Hitozan u disosovanom obliku u rastvoru ima izduženu konformaciju koja omogućava puno ispoljavanje potencijala naelektrisanih grupa. Derivatizacijom hitozana se može poboljšati rastvorljivost hitozana u vodi i na ovaj način se njegova antimikrobna aktivnost povećava (Chung *i sar.*, 2005; Xie *i sar.*, 2007). Smanjenjem molekulske mase hitozana takođe se poboljšava njegova rastvorljivost u vodi (Kurita *i sar.*, 1991), kao i sniženjem vrednosti pH ispod vrednosti pKa za hitozan. Uticaj pH je značajan i za hitozan u čvrstom stanju, ali u poređenju sa izduženom konformacijom polikatjona hitozana u rastvoru, hitozan

u čvrstom stanju, u obliku niti, filmova, membrana, hidrogela, mikrosfera i nanočestica dolazi samo površinski u kontakt sa supstratom. Aktivnost hitozana u čvrstom stanju se povećava sa povećanjem dodirne površine. Aktivnost hitozana u čvrstom obliku zavisi od karakteristika površine: hidrofilitnost, hidrofobnost, zeta ( $\zeta$ ) potencijal i morfologija: veličina i oblik čestica, debljina membrane hitozana. Menjanjem hidrofobnosti površine hitozana u čvrstom stanju, izmenom stepena deacetilovanosti i derivatizacijom može se uticati na povećanje aktivnosti (Kong *i sar.*, 2008; Sadeghi *i sar.*, 2008; Takahashia *i sar.*, 2008; Kong *i sar.*, 2010). Lagaron *i sar.* (2007) su pokazali da film formiran iz rastvora hitozana u sirćetnoj kiselini konstantno tokom stajanja otpušta biocidnu karboksilnu grupu u obliku sirćetne kiseline i ovaj mehanizam delovanja filma je označen kao slab. Daleko jači baktericidni efekat prema *S. aureus* je zapažen u kontaktu filma sa vodom, vodenim rastvorima ili hidrogelom sa velikim sadržajem vode, gde je došlo do brze migracije protonovanih glukozamina, delova molekula hitozana koji su rastvorljiviv u vodi.

Pokazalo se da hitozan ima izraženije baktericidno dejstvo na gram-pozitivne u odnosu na gram-negativne bakterije. Ova razlika u delovanju verovatno potiče od različitog naelektrisanja ćelijskog zida gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Kod gram-pozitivnih bakterija ćelijski zid je sagrađen od polisaharida, koji su nosioci negativnog naelektrisanja. Dodatna elektronegativnost potiče od fosfornih grupa tejhojne i tejhojuronske kiseline. Kod gram-negativnih vrsta, spoljna lipopolisaharidna membrana daje hidrofилnu površinu i smanjuje izloženost nesupstituisanih kiselih grupa (Chi, 2004). Ispitivanje aktivnosti hitozana prema gram-negativnim bakterijama, uključujući *E. coli* bakterije, *P. aeruginosa* i *S. Typhimurium*, sprovedeno je praćenjem promena spoljašnje membrane mikrobne ćelije pod elektronskim mikroskopom. Pokazano je da, pri koncentraciji hitozana 250 ppm i pH 5.3, dolazi do vidljivih promena na spoljašnjoj membrani bakterijskih ćelija. Ona se istanjuje i dolazi do formiranja vezikularnih struktura, što utiče na promenu propustljivosti membrane. Pri većim koncentracijama hitozana dolazi do formiranja čitavog nepropusnog omotača na površini ćelijskog zida (Nicholas, 2003).

Zbog pozitivnog naelektrisanja na C-2 atomu glukozaminskih jedinica pri pH 6 i nižoj, hitozan je rastvorljiviji i pokazuje izraženiju antimikrobnu aktivnost nego hitin. Pri pH 7 hitozan ne pokazuje baktericidno dejstvo iz dva osnovna razloga: velikog udela nenaelektrisanih amino grupa i slabe rastvorljivosti. Osim protonovanja amino grupa, broj amino grupa (stepen deacetilovanosti) na položaju C-2 molekula hitozana, je od velike važnosti u elektrostatičkoj interakciji. Veća količina amino grupa poboljšava antimikrobnu aktivnost. U slučaju kada je pH sredine iznad pKa hitozana, hidrofobni i helatni efekti su odgovorni za antimikrobnu aktivnost a ne elektrostatički efekti i smatra se da su ova dva efekta ključna za antimikrobnu efikasnost u slučaju kada hitozan nije u polikatjonskom obliku (Kong *i sar.*, 2010). Hitozan poseduje visok kapacitet heliranja različitih metalnih jona ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ ) i ovo svojstvo se koristi u različitim industrijama za uklanjanje ili vraćanje metalnih jona (Kurita, 1998). Metalni joni stabilizuju strukturu ćelijskog zida mikroorganizama i heliranje ovih jona je još jedan od mehanizama antimikrobnog delovanja hitozana (Rabea *i sar.*, 2003). Hitozan ima sposobnost heliranja dvovalentnih jona metala kako u kiseloj, tako i u neutralnoj sredini (Kong *i sar.*, 2008).

Rezultati koji ukazuju na povezanost molekulske mase i aktivnosti hitozana su različiti. Veći broj autora je potvrdio da hitozanski polisaharid ima jači baktericidni efekat (*L. monocytogenes* i *S. Typhymurium*) u odnosu na oligosaharid. Studija o očuvanju ribe uranjanjem u rastvor hitozana različitih molekulskih masa pokazala je da je uranjanje u rastvor hitozana većih molekulskih masa dalo najbolje rezultate u redukovanju broja mikroorganizama. To znači da stepen degradacije hitozana može uticati na njegovu moć očuvanja hrane kada se koristi uranjajući metod (Nicholas, 2003). Ima i suprotnih rezultata, gde je hitozan niže molekulske mase pokazao veću aktivnost prema *E. coli* ili da je aktivnost hitozana različitih molekulskih masa bila jednaka (Tikhonov *i sar.*, 2006). Molekulska masa hitozana zavisi od sirovine i procesa proizvodnje. Degradaciju molekula može izazvati temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, napon smicanja (Nadarajah, 2005).

Hitozanski film je primenjen na velikom broju prehrambenih proizvoda kao aktivni antimikrobni film. Pokazano je da hitozanski filmovi, primenjeni na Ementaler siru, potpuno inhibiraju rast *L. monocytogenes* i *L. innocua* tokom minimum 8 dana. Smanjenje efikasnosti sa vremenom je objašnjeno smanjenjem broja dostupnih amino grupa u molekulu (Coma *i sar.*, 2002). Slično, ispitivanjem uticaja hitozanskog omotača na kontrolu razvoja *L. monocytogenes* na gotovom jelu, pečenoj govedini, dobijeni rezultati su ukazali na značajno manji broj ćelija u prisustvu hitozanskog omotača (2-3 log nakon 28 dana na 4°C), u odnosu na kontrolni uzorak (Beverly *i sar.*, 2008). Nasuprot ovim rezultatima, primena plastičnog filma laminiranog hitozanom za kontrolu rasta *L. monocytogenes* na komadima šunke, nije dala zadovoljavajuće rezultate, pa su u laminirane hitozanske filmove inkorporirani različiti dozvoljeni baktericidi, i najbolje rezultate je pokazalo inkorporiranje 0.01 g Na-laktata/cm<sup>2</sup> filma (Ye *i sar.*, 2008).

Filmovi na bazi hitozana su doveli do smanjenja ili potpune inhibicije rasta *Enterobacteriaceae* i *S. liquefaciens* na površini tradicionalne kobasice pastrami, a nije pokazan nikakav uticaj na bakterije mlečnog vrenja, niti njihove metabolite (Ouattara *i sar.*, 2000).

Pored ovog efekta pokazano je i da hitozanski film odlaže rast *Alternaria* sp, *Penicillium* sp. i *Cladosporium* sp., sa slabim delovanjem na *Aspergillus* sp. (Rodriguez *i sar.*, 2003).

Ispitivanja o uticaju 1% hitozanskog filma na zaštitu fileta soma, u smislu održanja boje, inhibicije oksidacije lipida i mikrobnog kvara, pokazala su da hitozanski film omogućuje produženje održivosti fileta do 8 dana (Nadarajah *i sar.*, 2003).

Slično kao i kod antioksidativnog efekta, da bi se pojačala antimikrobna aktivnost hitozanskog filma, filmu se dodaju različite antimikrobne supstance. Ovaj dodatak je potreban jer hitozan u čvrstom stanju, tj. filmu može delovati antimikrobno samo na površini gde je u direktnom kontaktu sa supstratom. Da bi film ispoljio antimikrobno delovanje koje štiti masu supstrata potrebno je da antimikrobna komponenta ima sposobnost difuzije u masu supstrata ili u "in vitro" eksperimentu, u hranljivu podlogu. Zato se u matriks hitozanskog filma dodaje niskomolekularna antimikrobna supstanca koja može otpuštanjem iz filma difundovati u supstrat (Coma *i sar.*, 2002; Pranoto *i sar.*, 2005; Altioik *i sar.*, 2010). Različite grupe aktivnih

komponenti su testirane, a među njima: organske kiseline (sirćetna, benzoeva, mlečna, propionska, sorbinska, ferulna), estri masnih kiselina (gliceril monolaurat), polipeptidi (lizozim, peroksidaza, laktoferin i nizin), etarska ulja i ekstrakti biljaka (cimet, origano, limunska trava, beli luk, timijan), nitriti i sulfiti (Rojas-Graü *i sar.*, 2009; Mathew i Abraham, 2008; Pranoto *i sar.*, 2005; Ouattara *i sar.*, 2000; Chi et al., 2006; Altiok *i sar.*, 2010). Etarska ulja i ekstrakti biljaka se mogu smatrati prirodnom alternativom u zaštiti hrane i njihova upotreba je u saglasnosti sa težnjom potrošača ka prirodnoj, što manje hemijski tretiranoj hrani (Burt, 2004). Dva osnovna ograničenja upotrebe etarskih ulja u prehrambenoj industriji su izražena organoleptička svojstva koja mogu uticati na senzorsku prihvatljivost hrane i gubitak aktivnosti usled interakcije sa komponentama hrane (Gutierrez *i sar.*, 2008; Rojas-Graü *i sar.*, 2009).

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljaka odavno je poznata, ali je zadnjih godina sve veći broj istraživanja u oblasti primene etarskih ulja kao komponenti aktivnog pakovanja. Ipak, najveći broj istraživanja bavi se ispitivanjem antimikrobnog dejstva "*in vitro*", a tek manji broj radova bavio se ispitivanjem antimikrobnog dejstva ulja u samim prehrambenim proizvodima (Skandamis i Nychas, 2002). Etarska ulja origana, bosiljka i korijandera pokazala su aktivnost prema *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *A. niger*, *G. candidum* i *Rhodothorula*, dok je anis, iako bez izražene antibakterijskog delovanja, pokazao izrazito inhibitornim za kvasce i plesni (Elgayyar *i sar.*, 2001; Hammer *i sar.*, 1999; Delaquis *i sar.*, 2002). Istraživanja idu u pravcu primene etarskih ulja, kao dodatka klasičnom pakovanju, u cilju suzbijanja razvoja patogenih organizama razvijenih u samoj hrani.

Generalno, fenolna jedinjenja i terpeni su jedinjenja koja najviše doprinose antimikrobnoj aktivnosti etarskih ulja. Mehanizam antimikrobnog delovanja etarskih ulja nije utvrđen, ali su predloženi različiti mehanizmi mogućih delovanja:

1. Jedinjenja iz ulja interferiraju sa fosfolipidima ćelijske membrane, povećavajući njenu specifičnu propustljivost, te ubrzavajući gubitak ćelijskih konstituenata (Lambert *i sar.*, 2001);
2. Uticaj na rad enzimskih sistema ćelije mikroorganizma, uključujući one koji učestvuju u produkciji energije i sintezi strukturnih komponenti i/ili
3. Oštećenje genetskog materijala ćelije mikroorganizma (Kong *i sar.*, 2010).

Ispitivanjem inhibitornog efekta ekstrakata različitih biljaka (anisa, bosiljka, šargarepe, celera, korijandera, origana, ruzmarina, anđelike, kardamoma, mirođije, peršuna) na različite mikroorganizme (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O:157:H7, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *L. plantarum*, *A. niger*, *Geotrichum* i *Rhodotorula*) dobijeni su različiti rezultati, od potpune inhibicije, koju je pokazalo ulje origana, do toga da nema uticaja, kod ulja šargarepe. Pored origana, čije je ulje je pokazalo najjači efekat, značajan uticaj pokazala su i ulja korijandera, bosiljka i anisa. Na osnovu rezultata, data je i preporuka upotrebe ovih ulja kao aditiva, u cilju zaštite hrane od kontaminacije (Elgayyar *i sar.*, 2001).



U prilog upotrebi etarskih ulja biljaka u zaštiti hrane, ili u farmaceutske svrhe idu i rezultati ispitivanja 52 biljna ulja i ekstrakta na aktivnost protiv *A. baumannii*, *A. veronii sobria*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. marcescens* i *S. aureus*. Tropska vrsta limun trava (*Cymbopogone citratus*), origano i lovor su inhibirali sve organizme pri koncentraciji 2% (Hammer *i sar.*, 1999).

Ispitivanjem antimikrobnog delovanja etarskih ulja različitih začina (anis, bosiljak, korijander i origano) prema *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7 utvrđeno je da je etarsko ulje origana (origano >> korijander > bosiljak > anis) pokazalo najjače delovanje (Jeon *i sar.*, 2002).

Pored već pomenutog antioksidativnog delovanja, ulje kima i njegove osnovne komponente, karvon i limonen su pokazali antimikrobna svojstva prema različitim plesnima i bakterijama (Aggarwal *i sar.*, 2002; Simić *i sar.*, 2008; Dimić *i sar.*, 2009). Literaturni podaci za aktivnost etarskog ulja kima variraju, od izražene antimikrobne aktivnosti, preko umerene do podataka da prema većini gram pozitivnih i gram negativnih bakterija nije utvrđena aktivnost (Mohamed *i sar.*, 2013; Alboofetileh *i sar.*, 2014; Cvijović *i sar.*, 2010).

Najčešće korišćene metode u testiranju antimikrobne aktivnosti biopolimernih filmova su: agar difuziona metoda, metoda mikrotitar ploča i ASTM E 2149-01 metoda u suspenziji mikroorganizama.

Agar difuziona metoda se može izvoditi na dva načina. U oba slučaja u Petri ploče se izlije odgovarajuća podloga i zaseje ćelijama mikroorganizama. U prvoj varijanti metode, ispitivani uzorci se izrežu na male, kružne komade, sterilišu, postavljaju na Petri ploču i ostave da se inkubiraju na određenoj temperaturi i za određeno vreme (Pranoto *i sar.*, 2005, Dilamian *i sar.*, 2013, Pelissari *i sar.*, 2009). U drugoj varijanti metode, na inokulisanoj podlozi u Petri ploči se naprave bunarčići pomoću kružnog noža, a potom se ti bunarčići pune filmogenim rastvorima i ploče se, takođe, ostave da se inkubiraju na određenoj temperaturi i za određeno vreme (Guirguis *i sar.*, 2013). Podloga, temperatura i vreme inkubacije se razlikuju, u zavisnosti od toga koji mikroorganizam se koristi u toku ispitivanja. Nakon inkubacije, ploče se pregledaju kako bi se odredila širina zone inhibicije. Zona inhibicije predstavlja čistu zonu koja se pojavljuje oko diska ili bunarčića na površini agara i na kojoj nema rasta mikroorganizama. Pošto je utvrđeno da hitozan nema sposobnost da difunduje u okolni agar, da bi došlo do pojave zone inhibicije potrebno je da su u hitozanske filmove inkorporirane neke antimikrobne supstance koje mogu da difunduju (Rodríguez-Núñez *i sar.*, 2012, Dilamian *i sar.*, 2013, Pranoto *i sar.*, 2005, Pelissari *i sar.*, 2009).

Test mikrotitar ploča se izvodi u polipropilenskim mikrotitar pločama. Ćelijske kulture se inkubiraju na određenoj temperaturi i za određeno vreme, u zavisnosti od toga koji mikroorganizmi se koriste za test. Test se sprovodi punjenjem bunarića podlogom kojoj se dodaje filmogeni rastvor. Svaki od njih se inokuliše bakterijskom kulturom. Ćelijski rast se određuje pomoću očitavanja stepena zamućenosti medijuma na 620 nm, pomoću čitača mikrotitar ploča. Rezultati se predstavljaju grafički, odnosno, kao odnos koncentracije aktivne komponente i izmerene apsorbance na 620 nm, nakon određenih vremenskih intervala (Leceta *i sar.*, 2013).

Američka standardizovana metoda ASTM E 2149-01 se koristi za određivanje antimikrobne aktivnosti imobilisanog antimikrobnog agensa pod dinamičkim kontaktnim uslovima (Radheshkumar i Münstedt, 2006; Gupta i Haile, 2007; Periolatto *i sar.*, 2012). ASTM E2149-01 metoda je dizajnirana za određivanje procene delovanja uzoraka koji sadrže neinspirajuće antimikrobne komponente, na rast mikroorganizama u dinamičkim uslovima. Ova metoda, koja je zasnovana na konstantnom mućkanju Erlenmajerice sa imobilisanim uzorkom, predstavlja razvijenu rutinsku kontrolu kvaliteta u nameri da se savladaju poteškoće koje se javljaju kod klasičnih antimikrobnih testova za procenu aktivnosti uzoraka sa antimikrobnim supstancama. Ove poteškoće podrazumevaju: obezbeđivanje kontakta inokuluma sa tretiranom površinom, fleksibilnost uzorkovanja u različitim kontaktnim intervalima, korišćenje nepristupačnih statičkih uslova, osetljivost i reproduktivnost. Antimikrobna aktivnost uzorka se određuje poređenjem rezultata test uzorka sa kontrolnim uzorkom bez inkorporiranog antimikrobnog agensa. Prisustvo ispirajućih antimikrobnih komponenti je određeno pojavom zone inhibicije. Metoda ASTM E2149-01 osigurava dobar kontakt između bakterije i tretiranog materijala, ili nekog drugog supstrata, usled konstantnog mućkanja testiranog uzorka u bakterijskoj suspenziji tokom perioda sprovođenja testa. Test je pogodan za procenu modifikovanih uzoraka i uzoraka izloženih prethodnom tretmanu kada se porede sa adekvatnom kontrolom.

## 2.7. Primena jestivih filmova u prehrambenoj industriji

Primena jestivih filmova u prehrambenoj industriji je za sada ograničena. U *Tabeli 7.* je dat prikaz prednosti primene jestivih filmova i premaza u prehrambenoj industriji.

**Tabela 7. Primena jestivih filmova (Galić, 2009)**

Svrha	Željeni kvalitet	Primena
Zaštita od vlage i kiseonika	Dobra svojstva prevlačenja, niska propustljivost za vodenu paru i kiseonik (moguć dodatak antioksidansa)	Sveža riba, sir, meso, mesni proizvodi; Hrana srednjeg sadržaja vlage; suva hrana, orasi, suvi pekarski proizvodi; "snack"-hrana (grickalice)
Usporavanje mikrobiološkog kvarenja spolja	Dodatak antimikrobnih agenasa	Hrana srednjeg sadržaja vlage
Kontrola ravnoteže vlage unutar heterogenih proizvoda, kontrola migracije rastvora, boja, arome unutar heterogenih proizvoda	Dobra barijerna svojstva za vodu	Heterogeni proizvodi pite, pice, kolači, sendviči, heterogeni smrznuti proizvodi
Sprečavanje penetracije salamure u hranu	Dobra barijerna svojstva za vodu i rastvore	Usalamureni smrznuti proizvodi (škampi, rakovi i sl.)
Poboljšanje mehaničkih svojstava tokom rukovanja	Dobra adhezivna i kohezivna svojstva	Kikiriki, škampi, rakovi, "snack"-hrana i dr.
Osiguranje strukturnog integriteta; pojačanje strukture hrane	Dobra adhezivna i kohezivna svojstva	Mesni i riblji proizvodi, mehanički otkoštено meso; liofilizovane porcije hrane ili porcije suve hrane
Osiguranje adhezivnosti smese za paniranje tokom prženja	Dobra adhezivnost	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Sprečavanje migracije vlage pri nanošenju prevlake maslaca i hlebnih mrvica u procesu paniranja	Dobra adhezivnost i niska propustljivost za vodu	Panirana hrana, smrznuta hrana (riblji fileti, hamburgeri, narezani luk i dr.)
Zaštita većeg broja manjih komada hrane (pakovanih u vrećice ili šoljice)	Niska propusnost vode; ne sme biti lepljiv	Sir, voće srednjeg sadržaja vlage; smrznuta hrana; sladoled; proizvodi veličine jednog zalogaja
Osiguranje nelepljive i nemasne površine	Ne sme biti lepljiv	Kockice sira, suvo voće, konditorski proizvodi, "snack"-proizvodi, smrznuti proizvodi (npr. da bi se eliminisala upotreba masnog papira između hamburgera)
Poboljšanje izgleda površine hrane	Glatka, sjajna, staklasta površina	Pekarski proizvodi (šećerna i druge glazure); poslastice, orasi, voće srednjeg sadržaja vlage, "snack"-proizvodi
Pojačanje boje, arome i ukusa hrane (dekorativni efekat)	Dodatak boja, arome, začina	Različita hrana
Da sadrže prethodno odmerene porcije koje se otapaju u vodi ili toploj hrani	Sposobnost stvaranja kapsula rastvornih u vodi	Dehidrirane supe, instant čajevi ili kafa, praškasti napici, začini, zaslađivači

Većina hidrokolooidnih filmova se ne može koristiti za prehrambene proizvode sa visokom površinskom aktivnošću vode (tj.  $a_w > 0,94$ ) budući da podležu degradaciji, otapanju ili bubrenju u dodiru sa vlagom što ima za posledicu gubitak barijernih svojstava (Galić, 2009). Međutim, primena ovih filmova je moguća u slučajevima kada se zahteva kratkoročna zaštita hrane ili se, tako zaštićena hrana, smrzava neposredno nakon nanošenja zaštitnog filma. U poslednjem slučaju hrana postiže aktivitet vode koji odgovara temperaturi

smrzavanja ( $a_w=0,825$  pri  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ). Primena jestivih filmova uglavnom je ograničena na prehrambene proizvode s niskim ili srednjim udelom vlage, kao i na smrznute proizvode. Uopšteno se može reći da su jestivi filmovi osetljiviji na dodir vlažnih ruku kao i na promene okolnih uslova (naročito promene relativne vlage vazduha). Kod pakovanja u jestivu ambalažu takođe se preporučuje primena dodatnog ambalažnog materijala, koji, ne samo da će čuvati jestivi zaštitni film, već i integritet i bezbednost takvog pakovanja. Razvoj jestive ambalaže motivisan je s više aspekata (Lazić i Novaković, 2010):

- Nutritivnog (smanjuje se transfer vlage kod heterogenih proizvoda);
- Ekonomskog (smanjuju se ukupni troškovi pakovanja);
- Marketinškog (stvaraju se novi proizvodi—“različiti” od drugih)

## **2.8. Primena hitozanskih omotača i filmova za pakovanje ribe, mesa i njihovih proizvoda**

Zbog mogućnosti formiranja filmova, hitin i hitozan posebno privlače pažnju u oblasti proizvodnje jestivih omotača i filmova. Tako, hitozanski filmovi mogu da se koriste sa ciljem promene atmosfere u ambalaži, u cilju smanjenja gubitaka vlage i produženju održivosti namirnica. Pored ovih efekata, hitozan je pokazao i antibakterijsko delovanje. Ispitivana je i sposobnost hitozanskih filmova kao nosioca drugih aktivnih supstanci, kao što su organske kiseline, cinamaldehyd, etarska ulja biljaka (Nadarajah, 2005).

Zahtevi koje pakovanje prehrambenih proizvoda postavlja pred jestive omotače i filmove su slični za većinu ovih proizvoda: bezbednost, nutritivni kvalitet, stabilnost, ekonomičnost i visok kvalitet prehrambenih proizvoda na tržištu. U industriji prerade mesa i ribe, upotreba jestivih omotača i filmova ima više različitih funkcija. Gubitak vlage tokom skladištenja svežeg ili smrznutog mesa i ribe, kao i njihovih proizvoda dovodi do promene ukusa, boje i teksture, uz smanjenje mase proizvoda. Jestivi omotač dobrih barijernih svojstava prema vodenoj pari može umanjiti ovaj problem. Nakon otvaranja ambalaže pod vakuumom sa svežim mesom, dolazi do gubitka mase mesa od (3 - 5)%, usled isparavanje vlage. Ukoliko se pre pakovanja u vakuumu na meso nanese jestivi omotač, može se izbeći ovo smanjenje sadržaja vlage. Takođe, nakon pakovanja svežeg mesa ili ribe na plastične podmetače, može doći do otpuštanja tečnosti iz proizvoda, što upakovani proizvod čini manje privlačnim potrošaču i iz ovog razloga se u podmetače postavljaju upijajući jastučići. Upotreba jestivog omotača ili filma može zameniti upotrebu ovih jastučića i uticati na bolje zadržavanje vode u proizvodu. Brzina kojom dolazi do užegnuća usled lipidne oksidacije i do promene boje proizvoda može se značajno umanjiti upotrebom jestivih filmova niske propustljivosti za gasove, pri čemu ipak ne dolazi do formiranja anaerobnih uslova. Filmogeni rastvor koji se zagreje pre nanošenja na površinu proizvoda može uticati na smanjenje broja patogenih mikroorganizama ili mikroorganizama koji izazivaju kvar proizvoda i, delimično, inaktivirati nepoželjne proteolitičke enzime. Gubitak isparljivih komponenata arome

proizvoda, kao i upijanje stranih mirisa, može biti ograničeno upotrebom jestivih filmova. Jestivi filmovi mogu biti nosioci različitih aktivnih komponenti (antioksidansi, antimikrobni agensi), čime postaju aktivan ambalažni material, odnosno omogućavaju aktivno pakovanje. Ukoliko se jestivi film nanese na meso ili ribu pre termičke obrade paniranja ili pečenja (prženja), može se uticati na poboljšanje nutritivnih svojstava proizvoda zbog manjeg upijanja ulja (Gennadios *i sar.*, 1997).

Najčešće korišćen način primene hitozanskog filma kao ambalažnog materijala za pakovanje ribe, mesa i njihovih proizvoda je uranjajući metod. Postoje dve varijante ovog metoda. Prema prvoj, uzorci se uranjaju u rastvor hitozana ili rastvor hitozana sa dodatim aktivnim ili funkcionalnim komponentama i, kao takvi, ili upakovani u polietilenske kesice se skladište. Druga varijanta je da se nakon uranjanja uzorci pakuju u visokobarijerne materijale u vakuumu ili modifikovanoj atmosferi, gde sloj hitozana služi kao aktivna komponenta pakovanja. Uranjajući metod je korišćen u većem broju studija o produženju održivosti ribe, mesa i njihovih proizvoda. u radu koji se bavio zaštitom fileta haring i bakalara, napravljen je 1% (w/v) rastvor hitozana u 1% (v/v) rastvoru sirćetne kiseline. Nakon toga je rastvoru dodat glicerol u koncentraciji 1ml/g hitozana. Komadi ribe su uranjani i držani u rastvoru tokom 30 s, pa držani van rastvora 2 minuta, te ponovo uranjani na 30 s. Nakon toga, fileti su sušeni 2h na 40°C u sušnici sa ventilacijom, i na kraju skladišteni na  $(4 \pm 1)$  °C. Hitozanski premaz je pozitivno uticao na svojstva fileta ribe, smanjujući gubitak vlage i redukujući lipidnu oksidaciju, hemijski i mikrobiološki kvar. Efikasnost je zavisila od viskoziteta rastvora hitozana, pri čemu su veću efikasnost u zaštiti ribe pokazali hitozani većeg viskoziteta (Jeon *i sar.*, 2002). Slična metoda nanošenja premaza je prikazana u radu koji se bavio dejstvom hitozana, nanesenog na gotovo jelo-pečenu govedinu, na *L. monocytogenes*. Hitozan je rastvoren u 1% (v/v) mlečnoj ili 1% (v/v) sirćetnoj kiselini, tako da se dobije 1% (w/v) rastvor hitozana, a zatim je destilovanom vodom razblažen do 0.5% (w/v). Svi rastvori su podešeni na pH 5.6, a kontrolni komadi su premazani samo mlečnom ili sirćetnom kiselinom. Uzorci su uranjani i držani u rastvoru tokom 30 s, ocedeni i sušeni na laminarnom toku vazduha tokom 1h, pre nego što su spakovani u sterilne plastične vreće Whirl-Pack® i uskladišteni na 4 °C. Primenom hitozanskog premaza, postignuta je redukcija broja bakterija 1–3 log jedinica CFU/g nakon 28 dana skladištenja (Beverly *i sar.*, 2008). u još jednom radu, gotova jela na bazi mesa: pileće ćufte, pileći i ovčiji kebab su uronjeni u 2% (w/v) rastvor hitozana u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini (kontrola je uronjena samo u sirćetnu kiselinu), tokom 2 min, ocedeni i osušeni u sušnici sa cirkulacijom tokom 30 min, nakon čega su pakovani u sterilne LDPE kesice i skladišteni na  $(0 - 3)$  °C, tokom 14 dana. Uzorci sa hitozanskim omotačem su pokazali dužu održivost: eliminisani su fekalni koliformi, snižen je broj *Staphylococcus* spp., usporena je oksidacija bez značajnog uticaja na organoleptička svojstva (Kanatt *i sar.*, 2013). Uranjanjem fileta ružičastog lososa u 1% (w/v) hitozanski rastvor, smanjeno je otpuštanje vode iz fileta nakon odmrzavanja (Sathivel *i sar.*, 2007). U drugom, sličnom eksperimentu, hitozanski premaz je, pored smanjenja otpuštanja vode nakon odmrzavanja, doveo i do redukcije lipidne oksidacije

kod fileta ružičastog lososa tokom skladištenja u smrznutom stanju (Sathivel, 2005). Za studiju izvedenu na filetima kalifornijske pastrmke, fileti su uranjani u filmogeni rastvor 2% (w/v) hitozana u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini ili u isti filmogeni rastvor sa 1.5% (v/v) etarskog ulja cimeta. Fileti su uronjeni i držani u rastvoru tokom 30 s, nakon čega su ocedeni 2 min i ponovo uronjeni 30 s, ocedeni, osušeni 2 h na 10 °C, i uskladišteni na (4 ± 1) °C, tokom 16 dana. Kontrolni uzorci su ostavljeni bez premaza. Oba premaza, i hitozan i hitozan-etarsko ulje cimeta su doveli do produženja održivosti ispitivanih fileta: smanjenje ukupnog broja vijabilnih ćelija, smanjenje broja psihotropnih ćelija, usporavanje pojave hemijskog kvara i oksidacionih promena, kao i očuvanje senzorskih svojstava tokom skladištenja (Ojagh *i sar.*, 2010). Uranjanjem fileta sardine u hitozanski rastvor 1% (w/v) i 2% (w/v) u sirćetnoj kiselini 1% (v/v), postignuto je produženje održivosti fileta sa 5 dana na 8 i 10 dana tokom skladištenja na (1 - 2) °C, došlo je do inhibicije mikrobnog rasta, oksidacije i hemijskog kvara, poboljšanja sposobnosti vezivanja vode i smanjenja kala (Mohan *i sar.*, 2012). Uranjanjem fileta brancina u 1.5 (w/v) hitozanski rastvor u 0.6% (v/v) sirćetnoj kiselini, uz dodatak 0.5% (w/v) limunske kiseline ili 1% (w/v) vodenog ekstrakta korena sladića pokazan je zaštitni efekat premaza i produženje održivosti fileta tokom skladištenja na (4 ± 1) °C, tokom 12 dana (Qiu *i sar.*, 2014). U radu Xiufang i Boahua (2008), komadi ohlađenog svežeg svinjskog mesa su podeljeni u pet grupa: jedna grupa je uronjena u 1% (v/v) rastvor sirćetne kiseline, druga grupa je uronjena u etanol, treća grupa u 4% etanolni ekstrakt mešavine začina ruzmarina, cimeta i karanfilića, četvrta grupa se sastojala od uzoraka uronjenih u 0.5% rastvora hitozana u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini, a peta od uzoraka uronjenih u hitozanski rastvor, pa u etanolni ekstrakt mešavine začina. Uzorci iz svih pet grupa su praćeni tokom skladištenja na (4 ± 1) °C, tokom 28 dana. Hitozanski omotač je doprineo smanjenju kala, održivosti boje, smanjenju nivoa oksidacije i mikrobiološke kontaminacije. Ekstrakti začina su dodatno doprineli antimikrobnom i antioksidativnom delovanju. U sličnom istraživanju, Tajlandska grilovana svinjetina je uranjana u 2% (w/v) i 2.5% (w/v) rastvor hitozana u 1% (w/v) sirćetnoj kiselini, podešenog pH na 5.9, 1 min i osušena na 10 °C, tokom 30 min. Uzorci uronjeni samo u kiselinu su korišćeni kao kontrola. Nakon uranjanja, uzorci su upakovani u kesice PVDC/PA, u atmosferskim uslovima ili u vakuumu i skladišteni na (2 ± 1) °C, tokom 42 dana. Hitozanski omotač je uticao na smanjenje nivoa oksidacije, poboljšanje održivosti boje i smanjenje broja mikroorganizama u uzorcima. Vakuum upakovani uzorci sa hitozanskim omotačem čine uspešan sistem aktivnog pakovanja za produženje održivosti grilovane svinjetine (Yingyuad *i sar.*, 2006). U još jednoj studiji, uzorci fileta pilećih grudi su tretirani na tri različita načina: na uzorke je mikropipetom nanoseno 0.25% (v/w) etarskog ulja origana, uzorci su uranjani u 1.5% (w/v) rastvora hitozana u 1% (w/v) sirćetnoj kiselini ili je nakon uranjanja na uzorke nanoseno i etarsko ulje origana. Nakon ovog predtretmana, uzorci su upakovani u kesicu LDPE/PA/LDPE u modifikovanoj atmosferi: 30% CO<sub>2</sub> i 70% NO<sub>2</sub> i skladišteni na (4 ± 0.5) °C, tokom maksimalno 18 dana. Rezultati su pokazali da je tretman etarskim uljem origana doveo do produženja održivosti uzoraka od 6 dana, a tretman hitozanom, kao i kombinovani tretman hitozan-etarsko ulje, do produženja

održivosti od preko 15 dana (Petrou *i sar.*, 2012). U isto postavljenom eksperimentu, u kojem je umesto mesa pilećih grudi korišćeno polugotovo jelo pileći kebab i etarsko ulje origana zamenjeno etarskim uljem timijana, postignuti su približni rezultati. Hitozanski omotač u MAP-u je doveo do produženja održivosti uzorka 6 dana, a dodatni tretman etarskim uljem timijana uz hitozanski omotač u MAP-u do produženja održivosti od čak 8 dana (Giatrakou *i sar.*, 2010).

U radu Siripatrawan i Noipha (2012) prikazan je drugačiji način primene hitozanskog filma za pakovanje barene svinjske kobasice, u odnosu na uranjajuć metod. Sintetisan je hitozanski film iz 2% (w/v) rastvora hitozana u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini sa dodatkom 30% (w/w) glicerola na masu hitozana. Pored ovog filma, sintetisan je i hitozanski film sa istim sastavom uz dodatak 20% (w/v) ekstrakta zelenog čaja. Filmogene smeše su homogenizovane i uklonjeni su mehurovi vazduha, nakon čega su određene mase razlivene i sušenjem u ambijentalnim uslovima dobijeni su filmovi. Barena kobasica je umotana u sintetisane filmove, a kobasica koja nije umotana u film je korišćena kao kontrola. Uzorci su zatim upakovani u PA/LLDPE kesice i skladišteni na  $(4 \pm 1)$  °C, tokom 20 dana. Uzorci umotani u hitozanski film sa ekstraktom zelenog čaja su doprineli značajnom produženju održivosti boje kobasice, teksture, nižem sadržaju TBA reaktivnih supstanci, inhibiciji mikrobnog rasta i održanju senzorskih karakteristika. Uzorci umotani u hitozanski film su, takođe, doprineli produženju održivosti, u odnosu na kontrolnu kobasicu, ali u nešto manjoj meri.

Treći metod primene hitozanskog filma, prikazan u literaturi, korišćen je za komade šunke i hladnodimljenog lososa, i podrazumeva formiranje plastičnog filma oslojenog hitozanom sa ili bez inkorporiranja antimikrobnih agenasa. Za formiranje oslojenog filma za pakovanje komada šunke, upotrebljen je 2% (w/v) rastvor hitozana u 1% rastvoru sirćetne kiseline i ostavljen u toku noći. Napravljen je rastvor hidropsipropilceluloze (HPMC) i polietilenglikola odgovarajućih koncentracija u sirćetnoj kiselini. Rastvor za formiranje prvog hitozanskog sloja dobijen je mešanjem jednakih zapremina dva rastvora, jer bez HPMC ne bi moglo doći do ravnomernog vezivanja prvog sloja za plastičnu Surlyn® foliju. Na plastični film je aplikatorom za tankoslojnu hromatografiju nanescena mešavina dva rastvora. Nakon sušenja ovog sloja na vazduhu tokom noći, nanesen je sloj rastvora hitozana kao drugi sloj, po istoj proceduri, a zatim je formiran i treći sloj. Nakon sušenja, folija je podvrgnuta sterilizaciji UV zracima. Uzorci šunke su umotani u oslojenu plastičnu foliju, dok su kontrolni uzorci umotani u plastičnu foliju bez hitozana i svi su upakovani u barijerne kese PA/PE i upakovani u uslovima vakuuma, nakon čega su skladišteni na 20 °C tokom 10 dana. Testirana je antimikrobna aktivnost filma prema *L. monocytogenes* (Ye *i sar.*, 2008). U drugoj varijanti ove metode primene hitozanskog premaza za hladnodimljenu ribu na LDPE film je nanesen samo jedan aktivni sloj koji se sastojao od 2 dela rastvora HPMC i 13 delova rastvora hitozana sa antimikrobnim komponentama. Nakon sušenja aktivnog sloja, komadići ribe su inokulisani sa 5 sojeva *L. monocytogenes* i umotani u film, nakon čega su upakovani u

visokobarijernu kesu u vakuumu i uskladišteni na 20 °C tokom 10 dana. Testirana je antimikrobna aktivnost filma (Ye *i sar.*, 2008<sup>a</sup>).

Hitozan je korišćen i kao kopolimer za formiranje aktivnog LDPE-hitozan filma za očuvanje boje odrezaka svežeg mesa. Hitozanski rastvor 2% (w/v) u mlečnoj kiselini 2% (w/v) je sterilisan i dodavan u LDPE granulatu uz mešanje tučkom u avanu 30 min, nakon čega je isparena mlečna kiselina. Filmovi su formirani na dva načina: razlivanjem na aluminijumskoj podlozi (0%, 0.3%, 0.7%, 1.4% i 2.1% hitozana u smeši) i presovanjem između dva aluminijumska valjka (120 °C, 10 MPa, 90 s; koncentracije hitozana u smeši 0%, 1%, 4% i 8%). Filmovi formirani prema prvoj opisanoj metodi su testirani na antimikrobnu aktivnost “*in vitro*”, dok su filmovi prema drugoj metodi korišćeni za pakovanje odrezaka mesa, tako što je film omotan oko mesa, a zatim je tako omotan odrezak postavljen u kesu i upakovan pod parcijalnim vakuumom i uskladišten na  $(3 \pm 1)$  °C uz osvetljenost od 1100 Lux, tokom 10 dana. Ovakvim pakovanjem je postignuta produžena održivost boje svežeg mesa tokom skladištenja (Park *i sar.*, 2010).



## 2.9. Suve fermentisane kobasice

Prema Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, broj 31/2012), fermentacija je postupak konzervisanja proizvoda uz učešće mikroorganizama, pri čemu se menjaju vrednost pH, miris, ukus i druge osobine proizvoda. Fermentacija i sušenje su, uz soljenje i dimljenje, jedni od najstarijih načina konzervisanja, a kobasice jedan od najstarijih proizvoda od mesa (Toldrá *i sar.*, 2001; Škaljac, 2014).

Fermentisani proizvodi od mesa se proizvode i konzumiraju u svim delovima sveta i predstavljaju jednu od važnijih namirnica u ishrani ljudi. Procesima fermentacije menjaju se svojstva upotrebljenih sastojaka, proizvod poprima karakteristična senzorska svojstva, postaje mikrobiološki bezbedan i održiv tokom dužeg perioda (Hutkins, 2006). Danas se poklanja sve veća pažnja tradicionalnom načinu proizvodnje fermentisanih proizvoda od mesa, zbog njihove veće potražnje na tržištu, usled poželjnih i prepoznatljivih senzorskih svojstava (Rašeta *i sar.*, 2010). Fermentisane kobasice proizvodile su se u drevnoj Kini, u antičkoj Grčkoj i u Rimskom carstvu. Iako je proizvodnja ovih kobasica u svetu velika, ipak su one najzastupljenije u Evropi, i to u Nemačkoj, Italiji, Španiji i Francuskoj (Di Cagno *i sar.*, 2008). Suve fermentisane kobasice proizvode se, tradicionalno, u mediteranskim zemljama, još od davnina (Comi *i sar.*, 2005), a Evropa se i dalje smatra najvećim potrošačem ove grupe proizvoda (Talon *i sar.*, 2004, Lilić *i sar.*, 2013). U nekim zemljama Evrope, kao što su Italija, Španija i Francuska, kobasice se ne dime, nego se samo suše na vazduhu, dok se u drugim delovima, gde spada i Srbija, kobasice uvek dime. U ravničarskim krajevima naše zemlje, pretežno u Vojvodini, proizvode se, takođe od davnina, "sirove-osušene" kobasice užeg dijametra (npr. sremska kobasica) i šireg dijametra (npr. kulen). U brdovitim krajevima, pretežno nastanjenim muslimanskim življem, izrađuje se fermentisana kobasica uskog dijametra, od govedeg mesa, pod nazivom "sudžuk" (Petrović *i sar.*, 2007; Vuković, 2012, Škaljac, 2014). Proizvodnja suvih kobasica zasniva se, uglavnom, na lokalnim običajima i tradicionalnim načinima izrade koji se prenose sa kolena na koleno. Međutim, poslednjih decenija, ove kobasice se sve više proizvode u industrijskim uslovima, gde postoji potreba da se definišu postupci proizvodnje koji bi obezbedili ujednačen kvalitet proizvoda i njegovu bezbednost (Hutkins, 2006, Lilić *i sar.*, 2013).

Prema Pravilniku (Sl. glasnik RS, broj 31/2012), fermentisane kobasice su proizvodi dobijeni od mesa domaćih papkara i kopitara prve i druge kategorije, mesa živine prve kategorije i mesa divljači, masnog tkiva i dodataka, koji se posle punjenja u omotače konzervišu postupcima fermentacije i sušenja, odnosno zrenjem, sa ili bez dimljenja. Dodaci za fermentisane kobasice mogu da budu kuhinjska so, začini, ekstrakti začina, aditivi, arome dima, šećeri i starter kulture, a za fermentisane kobasice koje se u promet stavljaju kao funkcionalna hrana i dijetna vlakna, inulin, omega-3 masne kiseline i ulja bogata ovim kiselinama, fitosteroli, prirodni antioksidansi, vitamini i mineralne materije. Fermentisane kobasice se proizvode i stavljaju u promet kao: fermentisane suve kobasice,

fermentisane polusuve kobasice i fermentisane kobasice za mazanje. Fermentisane suve kobasice su proizvodi koji u trenutku kada su spremni za konzumiranje treba da sadrže manje od 35% vode. Proces sušenja se obavlja na nižim temperaturama, a tokom procesa zrenja formira se karakteristična, prijatna i pikantna aroma, čvršća konzistencija i dobra održivost ovog proizvoda (Petrović *i sar.*, 2007; Vuković, 2012, Škaljac, 2014, Lilić *i sar.*, 2013). Fermentisane suve kobasice u proizvodnji i prometu moraju da ispunjavaju sledeće zahteve (Sl. glasnik RS, broj 31/2012): da površina nije deformisana, da omotač nije oštećen i da dobro prileže uz nadev, da nadev na preseku ima izgled mozaika sastavljenog od približno ujednačenih komadića mišićnog tkiva crvene boje i masnog tkiva beličaste boje i da su sastojci u nadevu ravnomerno raspoređeni, da na preseku nema šupljina i pukotina, da imaju stabilnu boju i prijatan i karakterističan miris i ukus, da imaju čvrstu konzistenciju, da se mogu narezivati, a da se sastojci nadeva prilikom rezanja ne razdvajaju i da je sadržaj proteina mesa najmanje 20%, a sadržaj kolagena u proteinima mesa najviše 20%, ako to nije drukčije propisano ovim pravilnikom.

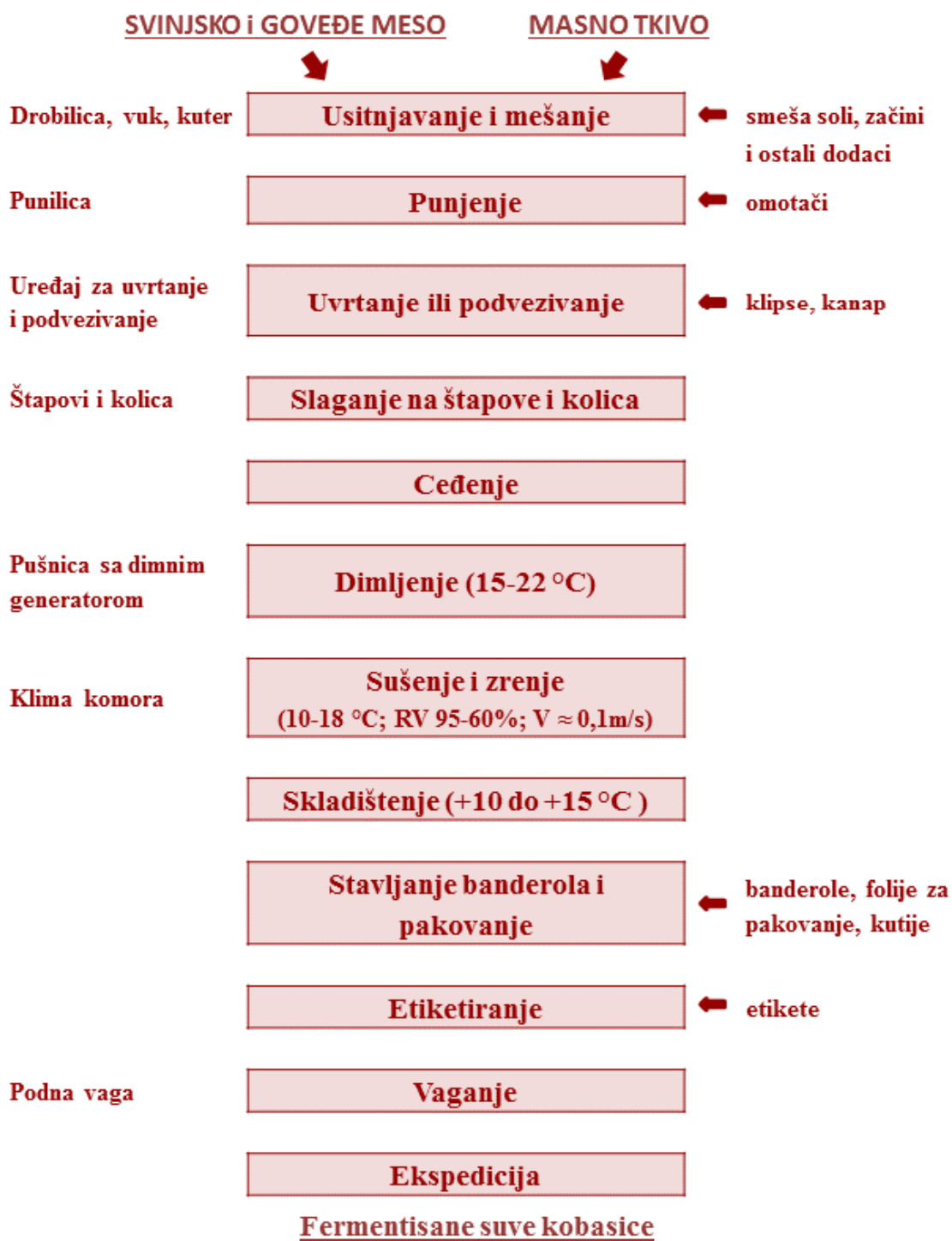
### 2.9.1. Proces proizvodnje suvih fermentisanih kobasica

Nadev fermentisanih suvih kobasica se priprema mlevenjem ohlađenog mesa i masnog tkiva na vuku i mešanjem, uz dodatak začina, šećera i soli. Ukoliko se koristi zamrznuto ili namrznuto meso i masno tkivo, usitnjavanje i mešanje se vrši u kuteru uz dodatak soli, začina i šećera (Vuković, 2012; Šojić, 2013). U tradicionalnoj proizvodnji fermentisanih kobasica, nadev se pre punjenja stavlja u hladnjaču na takozvano predzrenje, dok se u savremenoj proizvodnji nadev odmah puni u omotače. Za pravilno zrenje kobasica važno je da se iz nadeva odstrani vazduh i omotači čvrsto napune masom. Nadev fermentisanih kobasica puni se u prirodne ili veštačke omotače, koji treba da su dovoljno čvrsti, elastični i propustljivi za dim, vodenu paru i gasove (Vuković, 2006; Vuković, 2012, Šojić, 2013). Napunjene kobasice se podvezuju kanapom ili klipsaju, kače na štapove i odnose na sušenje i zrenje, gde se neko vreme čuvaju pri nižoj vlažnosti, kako bi se omotači zasušili (ceđenje) i tako pripremili za dimljenje (Ikonić, 2013). Fermentisane kobasice se, po hladnom postupku, dime na početku zrenja, najčešće na temperaturama od (12 – 25) °C, kada kobasica sadrži više vode i sastojci dima mogu lakše da difunduju u proizvod. Dimljenjem se postižu karakteristična aroma i izgled proizvoda, ali i određeni antimikrobni i antioksidativni efekti (Tasić, 2012). U savremenoj preradi mesa, dim se proizvodi pomoću dimogeneratora, a dimljenje se odvija u komorama specijalizovanim za tu namenu, sa mogućnošću regulacije temperature, vlage i količine dima. Nasuprot tome, u tradicionalnim pušnicama, dim se dobija sagorevanjem drveta u otvorenom ložištu, a ambijentalni uslovi u pušnici u velikoj meri zavise od spoljašnjih klimatskih uslova. Za proizvodnju dima najčešće se koristi tvrdo listopadno drvo: bukva, hrast, jasen. Međutim, u postupku dimljenja nekih tradicionalnih kobasica koristi se drvo koštuničavog voća (višnja, trešnja, kajsija) ili četinar (Vuković, 2006; Petrović *i sar.*, 2007; Šojić, 2013). Sušenje je osnovna fizička promena za vreme zrenja fermentisanih kobasica i ujedno najvažniji postupak konzervisanja, koji neposredno utiče

na održivost. U toku sušenja smanjuju se sadržaj vlage i aw-vrednost, a konzistencija kobasice postaje čvršća. Na nižoj aw-vrednosti inhibiraju se bakterije i usporava aktivnost enzima. Patogene bakterije ne mogu da rastu kada je aw-vrednost niža od 0.95, dok se bakterije važne za zrenje razvijaju pri aw-vrednosti od 0.90-0.94 i čine dominirajuću mikrofloru kobasice. Razvoj bakterija prestaje kada aw-vrednost bude niža od 0.90 i tada mogu da rastu samo kvasci i plesni (Vuković, 2012). Tokom procesa sušenja, istovremeno se odvijaju procesi fermentacije i zrenja, koji predstavljaju skup složenih biohemijskih procesa i promena čijim nastankom se sirovi nadev transformiše u dugotrajn, stabilan i bezbedan proizvod optimalne nutritivne vrednosti i senzorskog kvaliteta, bogate arome, definisane teksture i stabilne boje (Demeyer, 2004), pod uticajem enzimskog razlaganja proteina i masti, posredstvom delovanja endogenih enzima (enzimi iz mesa i masnog tkiva) i egzogenih enzima (enzimi poreklom od mikroorganizama). Ovi procesi dovode do toga da proizvod dobije karakteristična senzorska svojstva i dužu održivost. Karakterističan miris i ukus fermentisanih kobasica rezultat su delovanja nekoliko faktora. Pored izbora osnovnih sastojaka, soli, nitrita i začina, u formiranju poželjnih senzorskih svojstava značaj imaju i mikroorganizmi, proizvodi njihovog metabolizma i njihove hemijske i fizičke interakcije (Leistner, 2004). Bakterije mlečne kiseline, svojom metaboličkom aktivnošću, utiču na proces zrenja, dovodeći do stvaranja specifičnih senzorskih svojstava, istovremeno inhibirajući rast nepoželjnih mikroorganizama (Lindgren i Dobrogosr, 1990).

Snižavanje vrednosti pH je osnovna fizičko-hemijska promena tokom fermentacije, kao početne faze u izradi fermentisanih kobasica. Od vrednosti pH zavisi održivost proizvoda, stvaranje stabilne boje, povezivanje nadeva i formiranje konzistencije i arome kobasice. Snižavanje vrednosti pH se odvija na dva načina: fermentacijom šećera do mlečne kiseline i upotrebom aditiva za snižavanje vrednosti pH. Fermentacija je mikrobiološki proces razlaganja šećera i drugih organskih jedinjenja bez prisustva kiseonika do mlečne kiseline i drugih proizvoda. Šećere fermentišu mikroorganizmi mlečno-kiselog vrenja, koji se nalaze prirodno u kobasici (spontana mikroflora), ili se selekcionisani mikroorganizmi dodaju u kobasicu kao starter kulture. U zavisnosti od visine temperature okolnog vazduha, fermentacija može da traje od svega nekoliko sati, pa do deset i više dana, u tradicionalnim kobasicama čiji se proces proizvodnje odvija pri veoma niskim temperaturama (Vuković, 2006; Ikonić, 2013).

Za proces zrenja se može reći da traje od momenta izrade sirovog nadeva pa sve do momenta konzumiranja kobasice. Naime, ovaj proces podrazumeva promene na proteinima i lipidima mesa, odnosno procese proteolize i lipolize koji se dešavaju posredstvom delovanja enzima mišićnog i masnog tkiva, kao i enzima mikrobnog porekla (Gandemer, 2002; Toldrá, 2001). Šematski prikaz postupka proizvodnje suve fermentisane kobasice dat je na *Slici 31*.



Slika 31. Šematski prikaz procesa proizvodnje suvih fermentisanih kobasica (Škaljac, 2014)

### 2.9.2. Petrovačka kobasica (*Petrovská klobása*)

Tradicija proizvodnje Petrovačkog kulena (*Petrovská klobása*) duga je više od dva i po veka i povezana je sa naseljavanjem Slovaka u Vojvodinu i Bački Petrovac. Petrovački kulen (*Petrovská klobása*) se prvi put službeno pominje na velikoj izložbi poljoprivrednih proizvoda 1873. godine u Beču. Spada u fermentisane (trajne) proizvode visokog kvaliteta. Tradicionalno, Petrovačka kobasica proizvodi se u seoskim domaćinstvima tokom zimskih meseci kada je temperatura vazduha oko 0 °C ili niža, što uslovljava veoma spore procese fermentacije, sušenja i zrenja (do 120 dana). Ovaj proizvod izrađuje se isključivo od svinjskog mesa i čvrstog masnog tkiva, crvene ljute začinske paprike, soli, belog luka, kima i kristal šećera. Za razliku od industrijske proizvodnje fermentisanih kobasica, ova kobasica se proizvodi bez upotrebe aditiva i starter kultura, a za proces fermentacije i zrenja, kao i za krajnji kvalitet ovog proizvoda veoma je zaslužna mikroflora specifična za upotrebljenu sirovinu i dato okruženje (Petrović *i sar.*, 2007; Šojić, 2013).

Najvažnije je napomenuti da je ovaj proizvod potpuno prirodan, bez aditiva, konzervansa i sintetičkih dodataka. Oznaka geografskog porekla "*Petrovská klobása*" (Petrovačka kobasica) je upisana u Registar geografskih oznaka porekla, pod brojem 44, kao ime porekla za suhomesnati proizvod – fermentisanu kobasicu koja ima prijatan, blag miris na dim i aromu zrelog proizvoda, specifičnu za tu grupu fermentisanih proizvoda. Prijatnog je ukusa, pikantno ljutog ali ne kiselog. Proizvedena je u Bačkom Petrovcu, od domaće bele svinje u tipu Landrasa (krmača i kastrata starosti od 9 meseci - 12 meseci, mase 135 kg – 200 kg), po postupku proizvodnje i karakteristikama identičnim onima koje su navedene u „Tehnološkom elaboratu o načinu proizvodnje i specifičnim karakteristikama proizvoda „*Petrovská klobása*“ (Petrovačka kobasica)“. U Tehnološkom elaboratu (Petrović *i sar.*, 2007) definisani su parametri i kriterijumi kvaliteta, koji su iskazani kao standard koji se mora postići u izradi ove kobasice, koji će ubuduće moći nositi oznaku geografskog porekla (*Petrovská klobása* – Petrovačka kobasica). Definisani su sledeći kriterijumi kvaliteta: pH  $\geq$  5.4, sadržaj vode < 35%, sadržaj proteina mesa > 25%, sadržaj slobodne masti < 35%, RSPVT/PM < 15%, sadržaj NaCl < 3.5%, indeks proteolize > 15%, svetloća (L\*)= 32 - 37, čvrstoća=(10 – 15) N i ukupni senzorski kvalitet  $\geq$  4.5.

### 2.9.3. Pakovanje fermentisanih kobasica

Na kraju procesa proizvodnje, kobasice su spremne za kozumiranje. Do distribucije, kobasice se čuvaju (skladište) u komorama sa konstantnom temperaturom (15 °C) i relativnom vlažnošću vazduha ( $\approx$ 75%), u kojima je cirkulacija vazduha svedena na minimum da bi se smanjilo kalo kobasice (Ansorena i Astiasarán, 2004). Suve fermentisane kobasice se u maloprodaji često skladište u aerobnim uslovima, te je proizvod izložen delovanju kiseonika i, potencijalno, oksidativnim procesima. Proizvodi mesne industrije su posebno osetljivi na različite uticaje iz spoljašnje sredine, koji dovode do: gubitka vlage, promene boje, oksidacije lipida i mikrobiološke kontaminacije proizvoda (García-Esteban *i sar.*, 2004; Rede i Petrović, 1997).

Pod uticajem atmosferskog vazduha, tokom skladištenja u maloprodaji, nastavlja se dehidracija kobasica koja negativno utiče, kako na senzorska svojstva proizvoda

(naboranost površine omotača, tamna boja, suviše tvrda konzistenija), tako i na ekonomski efekat proizvodnje, s obzirom da dolazi do prekomernog gubitka mase.

Poželjna crvena boja fermentisanih kobasica, koja podseća na boju svežeg mesa, potiče od nitrozilmioglobina. Kod Petrovačke kobasice, boja najvećim delom potiče od začinske crvene paprike, a samo jednim delom od nitrozilmioglobina nastalog redukcijom nitrata iz mesa jer nema dodavanja nitrita u meso tokom procesa proizvodnje. Nitrozilmioglobin je stabilan u odsustvu kiseonika. Međutim, ukoliko je kiseonik prisutan, vrlo brzo dolazi do oksidacije nitrozilmioglobina u metmioglobin. Brzina oksidacije je direktno srazmerna parcijalnom pritisku kiseonika. Svetlost ubrzava oksidaciju nitrozilmioglobina na vazduhu. U aerobnim maloprodajnim uslovima, boja kobasice počinje da bleedi u roku od jednog sata, pod uticajem svetlosti i kiseonika (Robertson, 2006).

Oksidacija lipida je jedan od osnovnih uzroka pogoršanja kvaliteta proizvoda od mesa koji se odvija se u prisustvu kiseonika. Oksidacija lipida utiče na ukus, boju, teksturu i nutritivnu vrednost kobasica. Sa obzirom da je sadržaj lipida u suvim fermentisanim kobasicama relativno visok, njihovom oksidacijom se narušava senzorski kvalitet pojavom užeglog mirisa i ukusa i promenom boje proizvoda. Oksidacija, takođe, može da utiče na hranljivu vrednost namirnica razlaganjem vitamina, polinezasićenih esencijalnih masnih kiselina ili čak može dovesti do nakupljanja toksičnih jedinjenja (Ansorena i Astiasarán, 2004; Šojić, 2013).

Sastav mikroflore uzročnika kvara tokom skladištenja zavisi od kvaliteta mesa, sastava atmosfere oko proizvoda i od broja i sastava mikroflore na proizvodu pre pakovanja. Najčešći uzročnici kvara su vrste mikroorganizama koji najbrže rastu u uslovima u kojima se drži kobasica. Skladištenjem u aerobnim uslovima na niskim temperaturama (-1 do +5°C) dominiraju vrste roda *Pseudomonas*. U odsustvu glukoze, ove bakterije razgrađuju aminokiseline, usled čega se oslobađa amonijak, gas izuzetno neprijatnog mirisa. U anaerobnim uslovima dominiraju rodovi: *Lactobacillus* i *Enterobacteriaceae* i *B. thermosphacta*. U anaerobnim uslovima pri nižim temperaturama, najčešće prevladaju mlečnokisele bakterije (posebno *Leuconostoc*), koje nemaju štetne metabolite.

Mikrobiološka sigurnost se, pre svega, postiže higijenski odgovornim vođenjem procesa proizvodnje i pakovanja, snižavanjem koncentracije kiseonika i povišavanjem koncentracije ugljendioksida u ambalaži, skladištenjem pri niskim temperaturama (Robertson, 2006; Rede i Petrović, 1997). Efikasno rešenje za očuvanje kvaliteta za duži vremenski period skladištenja fermentisanih suvih kobasica ogleda se u pravilnom izboru ambalažnog materijala, kvalitetnom vođenju formiranja i zatvaranja ambalaže i upotrebi savremenih uslova pakovanja. Očuvanje senzorskih i nutritivnih svojstava i mikrobiološke sigurnosti proizvedenih kobasica omogućavaju savremeni postupci i uslovi pakovanja u vidu pakovanja u vakuumu i u modifikovanoj atmosferi (Šakota i sar. 2002; Lazić i sar. 2002).

Pakovanje u vakuumu značajno produžuje održivost fermentisane kobasice, sprečavajući ili usporavajući razvoj velikog broja aerobnih mikroorganizama, sprečavajući oksidaciju masnih kiselina i održavajući boju proizvedene kobasice. Da bi se izbeglo zaostajanje vazduha u ambalaži preporučuje se upotreba termoskupljajućih barijernih folija.

Uspešnost pakovanja u vakuumu zavisi od početnog mikrobiološkog i tehnološkog kvaliteta mesa, kao i od primene adekvatnih temperatura skladištenja. Pakovanje ne može doprineti poboljšanju karakteristika proizvoda lošeg kvaliteta ili mikrobiološki neispravnog proizvoda. Takođe, ambalažni materijal mora imati dobre fizičko-mehaničke i barijerne karakteristike uz pravilno, hermetično formiranje i zatvaranje ambalaže (Šakota *i sar.* 2002; Robertson, 2006).

Pakovanje u modifikovanoj atmosferi je savremeni metod pakovanja, gde se vazduh iznad proizvoda zameni smešom gasova, najčešće O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i N<sub>2</sub> određenih koncentracija. Prisustvo kiseonika se, kod pakovanja fermentisanih kobasica, ograničava do 0.5%, da bi se sprečila oksidacija masnih kiselina i nitrozilmioglobina. Ugljendioksid (CO<sub>2</sub>) se koristi zbog inhibitornog delovanja na aerobne mikroorganizme, moguće uzročnike kvara. Ugljendioksid se dobro rastvara u mastima, a rastvorljivost, pa samim tim i bakteriostatsko dejstvo je maksimalna na temperaturi od 5°C. Kao prateći gas uz CO<sub>2</sub> koristi se N<sub>2</sub>, koji je inertan gas. Od strane većeg broja autora preporučen je sastav atmosfere za pakovanje fermentisanih kobasica: 20-30% CO<sub>2</sub>, a ostatak čini N<sub>2</sub> (Ahvenainen, 2003; Robertson, 2006; García-Esteban *i sar.*, 2004). Gasna atmosfera iznad upakovanog proizvoda se tokom vremena skladištenja menja, zbog biohemijskih procesa u proizvodu, propustljivosti ambalažnih materijala za gasove ili nehermetičnosti varova (Tsigarida i Nychas, 2001). Više faktora utiče na održivost proizvoda pakovanih u modifikovanoj atmosferi: kontrolisana temperatura, higijenski uslovi, kvalitet proizvoda, veličina postora iznad proizvoda (preporučen je odnos proizvoda i slobodnog prostora 1:1), sastav gasova, sadržaj preostalih gasova (zavisi od korišćene tehnike u MAP-u), čistoća gasova, propustljivost ambalažnih materijala za gasove, kvalitet formiranja vara, hermetičnost ambalaže i adsorpcija gasova na površinu proizvoda (Skandamis i Nychas 2002; Houben *i sar.* 2000; Ahvenainen, 2003).

Za primenu vakuuma i modifikovane atmosfere za pakovanje fermentisanih kobasica moraju se upotrebiti ambalažni materijali dobrih barijernih svojstava. Najčešće su to folije osnovnog sastava poliamid (PA)/polietilen (PE), ili polietilentereftalat (PET)/ polietilen (PE) koje mogu da sadrže i barijerne slojeve etilen-vinil-acetat (EVA), etilen-vinil-alkohol (EVOH), poliviniliden-hlorid (PVDC) i druge. Ovi višeslojni ambalažni materijali se mogu proizvoditi različitim tehnologijama, kaširanjem, ekstruzionim oslojavanjem ili koekstruzijom. Od broja, osobina slojeva polimera i od primenjene tehnologije spajanja zavisi kvalitet višeslojne barijerne folije. Savremena tehnologija koekstruzije daje najveće mogućnosti dobijanja tankih višeslojnih folija željenih barijernih karakteristika (Lazić *i sar.*, 2002). Pored višeslojnih polimernih materijala, u cilju postizanja potpune barijere, koriste se i kombinovani ambalažni materijali u kojima je veoma tanak sloj aluminijuma vakuum oslojen na sloj PET-a (Lee, 2010). Iako svi navedeni materijali imaju dobra funkcionalna svojstva, nedostatak im je što se na mogu reciklirati, a imaju izuzetno dugačak životni vek, pa njihovo zbrinjavanje nakon upotrebe predstavlja veliko ekološko opterećenje.

Pored savremenih uslova pakovanja, aktuelnost aktivnih ambalažnih materijala i ambalaže raste, pa se tako pakovanje dalje optimizuje upotrebom različitih emitera (antimikrobnih agenasa, antioksidativnih agenasa, etilena i CO<sub>2</sub>) i apsorbera (vezuju etilen, vlagu, CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>). Kao nosioce aktivnih komponenti, moguće je koristiti biopolimere, materijale dobijene iz obnovljivih sirovina, najčešće valorizacijom otpada prehrambene i

agroindustrije. Pored jeftine sirovine za proizvodnju biopolimera, njihove funkcionalnosti kao ambalažnih materijala, mogućnosti primene za aktivno pakovanje, ovi polimeri su i biorazgradivi, a njihovom upotrebom se smanjuje obim problema zbrinjavanja velike količine ambalažnog otpada.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijal

Komercijalni hitozan niskog, srednjeg i visokog viskoziteta, polietilen oksid (prosečna molekulska masa 100 000) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal su proizvodi Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Luis MO, USA). Etarska ulja origana i kima su proizvodi firme Herba doo (Beograd, Srbija), a pčelinji vosak je nabavljen od lokalnog udruženja pčelara Medin med (Novi Sad, Srbija). Glacijalna sirćetna kiselina i Tween 20 su proizvodi firme Superlab (Beograd, Srbija). Kolageni omotači KOKO  $\phi$  55 su dobijeni od proizvođača Koteks Viscofan DOO (Novi Sad, Srbija).

##### 3.1.1. Priprema biofilmova

U velikom broju predeksperimentima, tokom uvođenja postupka sinteze hitozanskog biofilma, utvrđena je minimalna koncentracija hitozana za proizvodnju filma prihvatljivih senzorskih svojstava od 0.4% (w/v) u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini. Rastvori hitozana različitog viskoziteta: hitozan visokog viskoziteta (Hvv), hitozan srednjeg viskoziteta (Hsv) i hitozan niskog viskoziteta (Hnv) su pripremljeni rastvaranjem određene mase hitozana (0.4%, w/v) u sirćetnoj kiselini (1%, v/v), mešanjem na magnetnoj mešalici u toku 24 h. Nakon mešanja, rastvor se podvrgava vakuum filtraciji da bi se uklonile zaostale nerastvorene čestice, a dobijeni filtrat predstavlja filmogeni rastvor. Filmogeni rastvor je, pored dobijanja hitozanskih filmova, korišćen i za sintezu kompozitnog filma, mešanjem u odnosu 1:1 sa rastvorom 0.8% (w/v) poli (etilen-oksida) (PEO) u vodi. Dobijeni hitozanski i hitozan-PEO filmogeni rastvori su razliveni na Petri ploče, koje su postavljene na ravnu površinu (kontrola libelom), gde se odvija proces sušenja na sobnim uslovima (relativna vlažnost vazduha  $55\% \pm 10\%$ , temperatura  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Filmovi su, pre analiziranja, kondicionirani na sobnim uslovima u toku 3 dana. Hitozanski filmovi su označeni na osnovu hitozana od kojeg su dobijeni, kao:

- **Hnv**, film na bazi hitozana niskog viskoziteta
- **Hsv**, film na bazi hitozana srednjeg viskoziteta i
- **Hvv**, film na bazi hitozana visokog viskoziteta

a kompozitni filmovi imaju i dodatnu oznaku PEO:

- **HsvPEO**, film na bazi hitozana srednjeg viskoziteta i poli (etilen-oksida) i
- **HvvPEO**, film na bazi viskoviskoznog hitozana i poli (etilen-oksida)

##### 3.1.1.1. Priprema hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja origana i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača

Postupak pripreme započinje rastvaranjem 0.4% (w/v) hitozana u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini, mešanjem na magnetnoj mešalici u toku 24 h. U rastvor hitozana je dodata različita koncentracija etarskog ulja origana (EUO): 0% (v/v), 0.2% (v/v), 0.4% (v/v), 0.6% (v/v) i 0.8% (v/v) i površinski aktivne supstance Tween 20 (polovina zapremine dodatog ulja). Nakon toga, u cilju formiranja emulzije, smeša je lagano mešana na magnetnoj mešalici u toku 1 h, a nakon toga intenzivno mešana mikserom, 5 min. Nastala emulzija je ostavljena da

miruje sat vremena pri sobnim uslovima, tokom kojih zaostali mehurovi vazduha izlaze. Smeša je zatim filtrirana, uz primenu vakuuma, da bi se uklonile zaostale nerastvorene čestice. Dobijeni filtrat je razliven u Petri ploče (u masi od 40 g), koje su postavljajene na ravnu površinu (kontrola libelom), gde se odvija proces sušenja na sobnim uslovima (relativna vlažnost vazduha  $55\% \pm 10\%$ , temperatura  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Poslednji korak predstavlja kondicioniranje filmova, takođe na sobnim uslovima, u toku 3 dana.

Za formiranje hitozan-kolagen laminiranih filmova, filmogene smeše sa različitim koncentracijama EUO: 0% v/v, 0.2% v/v, 0.4% v/v, 0.6% v/v i 0.8% v/v, su nanesene na kolageni omotač, umesto razlivanja na Petri ploču, i na ovaj način su dobijeni laminirani omotači namenjeni za upotrebu u mesnoj industriji, za zaštitu suvih fermentisanih kobasica. Laminirani omotači su pripremljeni premazivanjem filmogene smeše preko kolagenog omotača četkicom sa prirodnim vlaknima u tri sloja. Pre nanošenja sledećeg sloja, nanese sloj je ostavljen da se osuši, minimalno oko 5h pri sobnim uslovima (relativna vlažnost vazduha  $55\% \pm 10\%$ , temperatura  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nakon sušenja poslednjeg sloja, omotači su 3 dana kondicionirani u sobnim uslovima.

#### **3.1.1.2. Priprema hitozanskog biofilma uz dodatak etarskog ulja kima i odgovarajućeg laminiranog kolagenih omotača**

Prema istom postupku kao i kod filmova i omotača na bazi hitozana sa etarskim uljem origana, pripremljena je filmogena emulzija sa dodatkom 0.8% (v/v) etarskog ulja kima (EUK). Ova filmogena emulzija je korišćena za dobijanje biofilмова razlivanjem na Petri ploče, kao i za dobijanje laminiranog kolagenog omotača premazivanjem filmogene emulzije preko kolagenog omotača u tri sloja. Film i laminirani omotač su označeni sa **0.8% EUK**, na osnovu sastava.

#### **3.1.1.3. Priprema hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja kima i različite koncentracije pčelinjeg voska i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača**

Rastvor hitozana je pripremljen rastvaranjem hitozana (0.8%, w/v) u sirćetnoj kiselini (1%, v/v). Da bi se hitozan rastvorio, rastvor je ostavljen preko noći na magnetnoj mešalici. Nakon rastvaranje hitozana, rastvoru je dodato EUK (0.8%, v/v) i površinski aktivna supstanca Tween 20 (0.4%, v/v), nakon čega je smeša zagrejana u vodenom kupatilu na  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uz mešanje laboratorijskom mešalicom da se dobije bela homogena emulzija. U istom vodenom kupatilu ( $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) otopljena je određena masa pčelinjeg voska i u nju je dodata napravljena emulzija uz mešanje. Na toplo je izvršena homogenizacija mešanjem pri 20 000 obrtaja/min tokom 2 min, nakon čega je emulzija ostavljena da miruje 2 min i još jednom homogenizovana pri 20 000 obrtaja/min tokom 2 min (Silent Crusher M, Heidolph, Nemačka). Šest različitih filmogenih emulzija je dobijeno dodatkom različite koncentracije voska: **0 kg/m<sup>3</sup>, 18 kg/m<sup>3</sup>, 36 kg/m<sup>3</sup>, 54 kg/m<sup>3</sup>, 72 kg/m<sup>3</sup>, 90 kg/m<sup>3</sup>**. Emulzije su razlivena na Petri ploče i ostavljene da se osuše na sobnim uslovima (relativna vlažnost vazduha  $55\% \pm 10\%$ , temperatura  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nakon sušenja, filmovi su kondicionirani još 3 dana na

sobnim uslovima, pre pristupanja analiziranju. Kao kontrola je korišćen čisto hitozanski film (bez EUK i voska), označen kao **0 (C)**.

Laminirani kolageni omotači su formirani premazivanjem filmogene smeše preko kolagenog omotača u tri sloja. Nakon sušenja, omotači su kondicionirani još 3 dana na sobnim uslovima. Nelaminirani kolageni omotač je korišćen kao kontrola i označen je kao **0 (Kol)**.

Za određivanje antioksidativnih i antimikrobnih svojstava hitozanskih biofilmova, pored već navedenih filmova korišćeni su i filmovi, označeni kao:

- **0%**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana
- **0.8% EUO**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana i 0.8% (v/v) EUO
- **0.8% EUK**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana i 0.8% (v/v) EUK
- **2% EUK**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana i 2% (v/v) EUK
- **3% EUK**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana i 3% (v/v) EUK,
- **18A**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana, 0.8% (v/v) EUK i 18 kg/m<sup>3</sup> pčelinjeg voska
- **36A**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana, 0.8% (v/v) EUK i 36 kg/m<sup>3</sup> pčelinjeg voska
- **54A**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana, 0.8% (v/v) EUK i 54 kg/m<sup>3</sup> pčelinjeg voska
- **72A**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana, 0.8% (v/v) EUK i 72 kg/m<sup>3</sup> pčelinjeg voska
- **94A**, sastav filma: 0.8% (w/v) hitozana, 0.8% (v/v) EUK i 94 kg/m<sup>3</sup> pčelinjeg voska

### 3.1.2. Proizvodnja Petrovačke kobasice ("*Petrovská kolbása*")

Kobasice su u sve tri proizvodne sezone napravljene prateći Tehnološki elaborat (Petrović *i sar.*, 2007) kao tradicionalni postupak izrade ove kobasice. Kobasice su izrađene od svinjskog mesa prve i druge kategorije (oko 85%) i čvrstog masnog tkiva leđa i vrata (oko 15%) koji su prvo samleveni (aparatus za mlevenje mesa PM-70/12, Mainca, St. Louis, Missouri, USA) na čestice veličine 10 mm, a onda su im dodati začini, u sledećim procentima: 2.50% crvene ljute paprike, 1.80% soli, 0.20% izgnječenog belog luka, 0.20% kima i 0.15% šećera. Svi sastojci su izmešani i mešavina je napunjena u kolagene omotače (55 mm prečnika) upotrebom vakuum punilice (VF 50, Albert Handtmann Maschinenfabrik GmbH & Co. KG, Biberach, Nemačka) i kobasice su ostavljene da se ocede tokom 24h. Nakon ceđenja, kobasice su odimljene u postupku koji je trajao 10 dana, sa pauzama. Nakon završenog dimljenja, kobasice su podvrgnute procesu sušenja i zrenja do postizanja sadržaja vlage < 35%, pri  $t = 8\text{ }^{\circ}\text{C} - 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  i relativnoj vlažnosti vazduha 90% - 75%.

U prvoj proizvodnoj sezoni je jedna polovina proizvedenih kobasica zaštićena sa tri sloja filmogene emulzije sastava: hitozan (0.4%, w/v) rastvoren u sirćetnoj kiselini (1%, v/v); EUO (0.2%, v/v) i površinski aktivna supstanca Tween 20 (0.1%, v/v). Svaki sloj je ostavljen da se

osuši pre nego što bi sledeći sloj bio nanesen. Druga polovina proizvedenih kobasica je ostavljena kao kontrolna. Kobasice su označene kao:

- **kontrolna kobasica i**
- **kobasica sa hitozanskim premazom.**

U drugoj proizvodnoj sezoni je razlika u proizvodnji kobasice bila ta što je u polovinu dobijenog nadeva dodata komercijalna starter kultura (Quick Starter, Lay Gewirce OHG, Nemačka) čiji sastav (*Staphylococcus carnosus* 25%, *Staphylococcus xylosus* 25%, *Lactobacillus sakei* 25%, *Pediococcus pentosaceus* 25%) najviše odgovara identifikovanom profilu autohtone mikroflore u tradicionalnoj proizvodnji, dok je druga polovina ostala nepromenjena. Kobasice sa i bez dodate komercijalne starter kulture su nakon proizvodnje podeljene u dve grupe: po jedna polovina je premazana filmogenom emulzijom, sastava: hitozan (0.4%, w/v) rastvoren u sirćetnoj kiselini (1%, v/v) sa etarskim uljem kima (0.8%, v/v) i površinski aktivnom supstancom Tween 20 (0.4%, v/v). Filmogena emulzija je nanescena u tri sloja, pri čemu je svaki sloj ostavljen da se osuši pre nego što bi sledeći sloj bio nanesen. Druga polovina od obe vrste proizvedenih kobasica je ostavljena kao kontrolna. Oznake kobasica su:

- **kontrolna kobasica:** za kobasicu bez dodate starter kulture i bez hitozanskog premaza
- **kobasica sa hitozanskim premazom:** za kobasicu bez dodate starter kulture i sa hitozanskim premazom
- **kontrolna kobasica SK:** za kobasicu sa dodatom starter kulturom i bez hitozanskog premaza
- **kobasica SK sa hitozanskim premazom:** za kobasicu sa dodatom starter kulturom i sa hitozanskim premazom

U trećoj proizvodnoj sezoni je, pored opisanog opšteg proizvodnog postupka, ukupna količina kobasica podeljena na dva dela i u jedan deo je dodata starter kultura u obliku maje (dobijena izolovanjem korisne mikroflore u proizvodnji ovog tipa kobasice u prethodnoj proizvodnoj sezoni), sastava 90% *Lactobacillus sakei* i 10% *Staphylococcus* spp. Svaka od dve dobijene grupe kobasica je podeljena na dva dela i jedan deo je premazan filmogenom emulzijom sastava: hitozan (0.8%, w/v) rastvoren u sirćetnoj kiselini (1%, v/v), EUK (0.8%, v/v), Tween 20 (0.4%, v/v) i pčelinji vosak (18 kg/m<sup>3</sup>). Filmogena emulzija je premazana u tri sloja, pri čemu je svaki sloj ostavljen da se osuši pre nego što bi sledeći sloj bio nanesen. Druga polovina od obe vrste proizvedenih kobasica je ostavljena kao referentna. Kobasice su označene kao:

- **kontrolna kobasica:** kobasica bez dodate autohtone starter kulture i bez hitozanskog premaza
- **kobasica sa hitozanskim premazom:** kobasica bez dodate autohtone starter kulture i sa hitozanskim premazom

- **kontrolna kobasica ASK:** kobasica sa dodatom autohtonom starter kulturom i bez hitozanskog premaza
- **kobasica ASK sa hitozanskim premazom:** kobasica sa dodatom autohtonom starter kulturom i sa hitozanskim premazom

Kobasice su čuvane u kontrolisanim uslovima temperature (15 °C) i relativne vlažnosti (75%). U određenim, zadatim, intervalima kobasice su uzorkovane radi praćenja parametara kvaliteta do isteka očekivanog roka upotrebe. Raspored uzorkovanja u sve tri sezone, dat je u *Tabeli 8.*

**Tabela 8. Raspored uzorkovanja Petrovačke kobasice tokom skladištenja**

Sezona	Raspored uzorkovanja (Dani od kraja sušenja)			
I	0	60	150	210
II	0	30	60	150
III	0	30	180	-

### **3.2. Metode ispitivanja**

#### **3.2.1. Ispitivanje fizičko-mehaničkih karakteristika biofilmova**

##### **3.2.1.1. Određivanje debljine**

Debljina filma merena je mikrometrom (type 30, Tesa, Switzerland), sa osetljivošću od 0.001 mm. Debljina uzorka merena je na deset pozicija, a rezultat je iskazan kao srednja vrednost merenja tri uzorka istog filma  $\pm$  standardna devijacija (SD).

##### **3.2.1.2. Određivanje zatezne jačine i izduženja pri kidanju**

Mehaničke osobine filmova, zatezna jačina (TS-tensile strength) i izduženje pri kidanju (EB-elongation at break), mereni su na aparatu Instron Universal Testing Instrument, Model No 4301 (Instron Engineering Corp., Canton, MA), prema ASTM standardnoj metodi D882-10 (ASTM, 2010). Uzorci filma sečeni su u pravougaone trake dužine 90 mm i širine 15 mm. Početni razmak između klema instrumenta podešen je na 50 mm.

Vrednost TS (MPa) je računata kao odnos maksimalne sile koju film trpi, pre kidanja, i poprečnog preseka filma, na koji deluje sila. Vrednost EB je računata kao odnos dužine uzorka pre (50 mm) i posle delovana maksimalne sile, u trenutku kidanja uzorka. EB je data kao procenat izduženja (%) (ASTM D882-10, 2010). TS i EB su računate kao srednje vrednosti minimalno pet ponavljanja, sa svaku veličinu.

#### **3.2.2. Ispitivanje strukturnih karakteristika biofilmova**

##### **3.2.2.1. ATR-FTIR spektrofotometrija**

FTIR analiza uzoraka filmova izvedena je u opsegu talasnih brojeva od 4000 do 600  $\text{cm}^{-1}$ , pri rezoluciji od 4  $\text{cm}^{-1}$ , na IR spektrofotometru, Nicolet iS10, Thermo Scientific (Massachusetts, USA), na dodatku za atenuaciju totalne refleksije (ATR). Svaki uzorak skeniran je 16 puta, dok je slepa proba snimana pre analize svakog uzorka. IR spektrofotometrom se upravlja preko računara, opremljenog softverom Omnic 8.1. (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

##### **3.2.2.2. Elektron skenirajuća mikroskopija (SEM)**

Mikrostruktura filmova je određena elektron skenirajućom mikroskopijom (SEM), koja je izvedena na elektronskom mikroskopu JOEL 6 400 LV SEM (Japan Electron Optics, Tokyo, Japan) pri naponu ubrzanja od 20 kV. Uzorci filma fiksirani su na alumunijumskim nosačima, celofanskim trakama i prevučeni tankim slojem zlata (20 nm), raspršenim po površini uzorka. Za analizu površine filma korišćena su uvećanja 500 $\times$  i 5 000 $\times$ , dok su za analizu poprečnog preseka filma korišćena uvećanja 500 $\times$  i 1 000 $\times$ .

### 3.2.3. Ispitivanje fizičko-hemijskih karakteristika biofilмова

#### 3.2.3.1. Određivanje sadržaja vlage

Uzorci filmova, dimenzija (2 x 2) cm, su izmereni na analitičkoj vagi ( $m_1$ ), i sušeni na  $103 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ , 24 h, nakon čega im je ponovo izmerena masa ( $m_2$ ). Uzorci su, po potrebi, dodatno sušeni do konstantne mase. Sadržaj vlage (%) je određen kao procenat gubitka početne mase filma, nakon sušenja, a rezultat je izražen na masu vlažnog uzorka, prema jednačini:

$$\text{Sadržaj vlage (\%)} = (m_1 - m_2) \times 100 / m_1 \quad (7)$$

Sadržaj vlage izražen je kao srednja vrednost tri nezavisna merena, za svaki film (Rhim *i sar.*, 2002). Pored određivanja sadržaja vlage filma kondicioniranog u sobnim uslovima, filmovi su, pre određivanja, kondicionirani i pri  $t = (23 \pm 3) \text{ °C}$  u različitim uslovima relativne vlažnosti vazduha,  $RH = 0\%$ ,  $RH = 50\%$  i  $RH = 90\%$ .

#### 3.2.3.2. Određivanje sposobnosti bubrenja

Uzorcima filmova, dimenzija (1 x 2) cm, izmerena je masa ( $m_1$ ) na analitičkoj vagi, a zatim su uronjeni u dejonizovanu vodu ( $25 \text{ °C}$ ), u trajanju od 2 min. Iz vlažnih uzoraka je, filter hartijom, uklonjen višak vode, nakon čega su uzorci izmereni na analitičkoj vagi ( $m_2$ ). Količina apsorbovane vode računata je prema jednačini (jednačina 8):

$$\text{Sposobnost bubrenja (\%)} = (m_2 - m_1) \times 100 / m_1, \quad (8)$$

gde su  $m_2$  i  $m_1$  mase vlažnog i suvog uzorka (Bigi *i sar.*, 2004). Za svaki film, test bubrenja je ponovljen tri puta. Osim u vodi, test na sposobnost bubrenja je određen i u puferima  $pH = 4$ ,  $pH = 7$  i  $pH = 9$ .

#### 3.2.3.3. Određivanje rastvorljivosti

Uzorci biofilma (2x2) cm su osušeni u sušnici na  $(103 \pm 2) \text{ °C}$ , tokom 24 h i izmereni na analitičkoj vagi, čime je dobijena početna suva materija filmova. Nakon merenja, svaki film je postavljen u čašu sa 50 ml destilovane vode i ostavljen tokom 24 h na sobnoj temperaturi, uz povremeno mućkanje. Nakon isteka 24 h, filmovi su izvađeni iz vode, osušeni u sušnici tokom 24 h na  $105 \text{ °C}$  i izmereni na analitičkoj vagi da se dobije suva materija filma nakon rastvaranja (Casariego *i sar.*, 2008). Rastvorljivost filmova (%) je izračunata na osnovu jednačine 9:

$$\text{Rastvorljivost (\%)} = (m_1 - m_2) \times 100 / m_1 \quad (9)$$

gde je  $m_1$  suva materija filma pre izvršenog testa rastvorljivosti, a  $m_2$  suva materija filma nakon izvršenog testa rastvorljivosti. Test za određivanje ukupne rastvorljivosti urađen je u tri nezavisna ponavljanja, a rezultat je dat kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

### 3.2.3.4. Određivanje boje

Boja je analizirana u CIE (International Commission on Illumination)  $L^*a^*b^*$  sistemu i opisana koordinatama svetloće ( $L^*$ ), udela crvene ( $a^*$ ) i udela žute boje ( $b^*$ ). CIE  $L^*a^*b^*$  koordinate boje su određene pomoću uređaja Minolta hromometar CR-400 sa Light Protection Tube CR-A33b (Minolta, Osaka, Japan) upotrebom D-65 osvetljenja,  $2^\circ$  standardnog ugla posmatrača i otvora u mernoj glavi od 8 mm. Uzorci filma stavljeni su na površinu bele standardne ploče, a na displeju instrumenta očitane su vrednosti veličina  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ . Veličina  $L^*$  određuje stepen svetloće (0 = crno, 100 = belo), veličina  $a^*$  karakteriše zelenu i crvenu nijansu filma ( $-a^*$  – zelena nijansa,  $+a^*$  – crvena nijansa) a veličina  $b^*$  plavu i žutu nijansu ( $-b^*$  – plava nijansa,  $+b^*$  – žuta nijansa). Za svaki film, test određivanja boje je ponovljen pet puta, a rezultat je dat kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Pre svake serije merenja, uređaj je kalibrisan pomoću bele keramičke pločice (CR-A43). Ukupna razlika u boji filmova, izražena kao vrednost  $\Delta E$  je izračunata na osnovu jednačine 10:

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2} \quad (10)$$

$L_0$ ,  $a_0$  i  $b_0$  su standardne vrednosti bele keramičke pločice  $L_0 = 96.86$ ,  $a_0 = -0.02$ , i  $b_0 = 1.99$ .

## 3.2.4. Ispitivanje barijernih svojstava biofilmova

### 3.2.4.1. Određivanje propustljivosti gasova

Određivanje propustljivosti gasova ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) izvedeno je prema proceduri Lyssy. Ova procedura predstavlja izostatičku gas-hromatografsku metodu (DIN 53380), koja se izvodi upotrebom Lyssy GPM-200 aparata, gasnog hromatografa, proizvođača Gasukuro Kogyo GC- 320 i HP 3396A integratora. Standardni Gow-Mac serije 552 gasni hromatograf, sa detektorom termičke provodljivosti, osnovni je instrument za kvantitativnu analizu. Gasni hromatograf, sa dvojnim sistemom kolona, sadrži kolonu Porapack QS (3 m) i kolonu sa molekulskim sitima (4.5 m), povezanih serijski, a odnos razdvajanja protoka gasova kroz kolone se može regulisati restrikcijom ventilom inkorporiranim ispred Porapack kolone, što omogućava razdvajanje svih poznatih gasova, posebno kiseonika i azota iz vazduha. Ispitivanja su vršena na  $23^\circ\text{C}$ , pri razlici pritiska od 1 bar. Uzorci filma su fiksirani na nosač i stavljeni u komoru za ispitivanje. Propustljivost gasova određena je pri izostatskim uslovima, u komori podeljenoj na dva dela uzorkom filma. Sa jedne strane filma, u komori je čist helijum, a sa druge, smeša gasova kiseonik, azot, ugljen dioksid (1:1:1). Pritisak je isti sa obe strane filma (0.2 bara). Tokom analize dolazi do postepenog zasićenja helijuma smešom gasova, u zavisnosti od propustljivosti filma. Koncentracija gasova u komori sa helijumom, detektovana je i određena gasnim hromatografom i integratorom. Površina pika na određenom retencionom vremenu, na dobijenom hromatogramu, predstavlja količinu propuštenog gasa iz smeše. Propustljivost vazduha računata je na osnovu sadržaja pojedinih gasova u vazduhu. Dobijeni rezultati izraženi su kao  $\text{ml}/(\text{m}^2\text{24h})$  pri razlici pritiska od 1 bar. Za svaki uzorak filma, urađena su tri ponavljena testa, a rezultat je prikazan kao srednja vrednost  $\pm$  SD.



### 3.2.4.2. Brzina propustljivosti vodene pare

Brzina propustljivosti vodene pare kroz filmove je određena gravimetrijskom metodom (metod sa posudicama), prema standardnoj metodi ISO 2528:1995, uslov A ( $t = 25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $RH = 90 \text{ } \% \pm 2 \text{ } \%$ ). Silika gel je korišćen kao desikant u test posudicama. Tri simultana ponavljanja su urađena za svaki uzorak filma, a rezultat je prikazan kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

### 3.2.5. Ispitivanje antioksidativnog potencijala biofilmova u rastvoru DPPH• radikala

Antiradikalska aktivnost rastvorenog dela biorazgradivog filma prema slobodnim DPPH• radikalima određena je spektrofotometrijskom metodom, merenjem promene koncentracije stabilnih DPPH• radikala, u prisustvu ispitivanih filmova. Antiradikalska aktivnost biorazgradivih filmova prema slobodnim DPPH• radikalima (AA, %) određena je po modifikovanoj metodi Morales i Jimenez-Perez (2001). Svež rastvor DPPH• radikala (0.16 mM) pripremljen je u etanolu. U 2.4 mL rastvora je postavljeno 100 mg filma koji se analizira i rastvor je postavljen na mešalicu tokom 2.5 h, 4 h i 24 h, na sobnoj temperaturi. Upravo je postavljena i slepa proba koja nije sadržala film. Nakon isteka zadatog vremena, film je uklonjen i preostala koncentracija DPPH• je određena merenjem apsorbance na 520 nm pomoću T80/T80+UV-Vis spektrofotometra (PG Instruments Ltd.). AA filmova je izračunata na osnovu jednačine 11:

$$AA (\%) = (1 - [DPPH\bullet]_t) \times 100 / [DPPH\bullet]_c \quad (11)$$

gde je  $[DPPH\bullet]_t$  koncentracija DPPH• za analizirani uzorak, a  $[DPPH\bullet]_c$  koncentracija DPPH• za odgovarajuću slepu probu. Za svaki film i svaki period vremena, test je ponovljen tri puta i rezultat je dat kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

### 3.2.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti biofilmova

Antimikrobna aktivnost je testirana prema odredbama standarda ASTM E2149, koji opisuje kvantitativni antimikrobni test pod dinamičkim uslovima kontakta. Kao test organizmi, odabrane su dve gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*) i dve gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*). Sveži inokulumi za antibakterijsku analizu su pripremljeni na hranljivom agaru (Merck, Germany), na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  tokom 24 h. Inkubirana test kultura je razređena sterilnim fosfatnim puferom (3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6.8) da se dobije koncentracija ćelija u kontaktu sa filmom od  $(1.5 - 3) \times 10^5$ . Ovako dobijen rastvor je korišćen kao radno bakterijsko razređenje.

Uzorci filma su tretirani UV lampom (Kruss, Germany): 254 nm tokom 0.5 h sa svake strane, isečeni na uzorke kontaktne površine  $58 \text{ cm}^2$  i prebačeni u Erlenmajer bocu od 250 mL koja je sadržala 50 mL radnog bakterijskog razređenja. Sve boce su začepljene i postavljene na tresilicu (Wrist Action incubator shaker) na 120 rpm tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon kontaktnog perioda od 3 h i 24 h, 1 mL bakterijskog razređenja je serijski razređen i prenesen na Trypton soja agar (Merck, Germany). Inokulisane Petri ploče su postavljene na

inkubaciju na 37 °C tokom 24 h, nakon čega je izvršeno brojanje kolonija. Prosečna vrednost dve paralele je preračunata kao CFU/mL u Erlenmajer boci, množenjem sa faktorom razblaženja. Antimikrobna aktivnost je izražena kao redukcija broja mikroorganizama nakon kontakta sa uzorkom filma u odnosu na početni broj mikroorganizama (jednačina 12):

$$R, \% \text{ (CFU/mL)} = (B-A) \times 100 / B \quad (12)$$

gde A predstavlja broj vijabilnih ćelija (CFU/mL) u boci sa analiziranim uzorkom filma nakon određenog perioda kontakta, dok B predstavlja broj vijabilnih ćelija (CFU/mL) u boci u "nultom" vremenu, pre dodatka analiziranog uzorka.

### **3.2.7. Parametri kvaliteta Petrovačke kobasice ("Petrovská kolbása")**

#### **3.2.7.1. Sadržaj vlage**

Sadržaj vlage u uzorcima Petrovačke kobasice određen je referentnom SRPS ISO 1442 metodom (1998). Princip određivanja zasniva se na potpunom mešanju uzorka za ispitivanje sa kvarcnim peskom i sušenju do konstantne mase na  $(103 \pm 2)$  °C. Sadržaj vlage u uzorku izražen je u procentima (%).

#### **3.2.7.2. Vrednost pH**

Vrednost pH određena je upotrebom prenosnog pH metra (Consort C931, Turnhout, Belgium) opremljenog ubodnom ojačanom staklenom kombinovanim elektrodom (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) za direktno određivanje vrednosti pH u mesu i proizvodima od mesa, prema standardu SRPS ISO 2917 (2004). Pre i tokom očitavanja pH metar je kalibrisan standardnim fosfatnim puferima (pH 7.02 i pH 4.00, na 20 °C) i podešen na izmerenu temperaturu uzoraka Petrovačke kobasice.

#### **3.2.7.3. Instrumentalno određivanje boje**

Boja kobasice je određena na površini i na preseku kobasice. Na preseku je boja merena odmah nakon sečenja uzorka da bi se sprečila degradacija boje pod uticajem svetla i kiseonika iz vazduha. Debljina uzorka je iznosila 3 cm. Boja je analizirana u CIE  $L^*a^*b^*$  sistemu i opisana koordinatama svetloće ( $L^*$ ), udela crvene ( $a^*$ ) i udela žute boje ( $b^*$ ). CIE  $L^*a^*b^*$  koordinate boje su određene pomoću uređaja Minolta hromometar CR-400 sa Light Protection Tube CR-A33b (Minolta, Osaka, Japan) upotrebom D-65 osvetljenja, 2° standardnog ugla posmatrača i otvora u mernoj glavi od 8 mm. Pre svake serije merenja, uređaj je kalibrisan pomoću bele keramičke pločice (CR-A43).

#### **3.2.7.4. Masnokiselinski sastav**

Za određivanje masnokiselinskog sastava uzoraka kobasice korišćena je metoda ekstrakcije po Folch *i sar.* (1957). Metil estri masnih kiselina pripremljeni su uz pomoć rastvora KOH u metanolu ( $c = 2$  mol/l). Masnokiselinski sastav određen je primenom gasne hromatografije. Za određivanje masnokiselinskog sastava korišćen je Gasni hromatograf (Perkin-elmer Varian 1400) povezan sa punjenom kolonom ( $l = 3$  m,  $d = 3.0$  mm; stacionarna faza - GP 10% SPTM-2330) i plameno jonizacionim detektorom. Temperatura u injekcionom

bloku i detektoru iznosila je 250 °C. Pri gasno-hromatografskoj analizi kao gas nosač korišćen je N<sub>2</sub>, protoka 20 mL/min. Zapremina uzorka iznosila je 2.0 µl. Metil estri masnih kiselina, izraženi u %, određeni su u poređenju sa retencionim vremenima standardnih supstanci (Sigma-Aldrich Chemical, USA). Rezultati su prikazani kao odnos ukupnih nezasićenih prema ukupnim zasićenim masnim kiselinama (NMK/ZMK).

### 3.2.7.5. Sadržaj malondialdehida (TBARS test)

Sadržaj malondialdehida određen je spektrofotometrijskom metodom (Botsoglou *i sar.*, 1994; Mandić, 2007) koja se zasniva na merenju apsorbancije kompleksnog obojenog jedinjenja nastalog reakcijom malondialdehida (MDA) i 2 molekula tiobarbiturine kiseline (TBA) na talasnoj dužini 532 nm. Apsorbancija je očitana pomoću spektrofotometra Jenway 6300 (Jenway, Felsted, United Kingdom). Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu zavisnosti koncentracije standardnog rastvora MDA i očitanih vrednosti apsorbancija na 532 nm. Za ispitivani uzorak je određena apsorbanca, a MDA vrednost je izračunata na osnovu jednačine 13:

$$\text{MDA (mg/kg)} = 16 \cdot c \cdot f / m, \quad (13)$$

gde su: c- koncentracija MDA (µg/ml) očitana sa kalibracione krive, f- faktor razblaženja uzorka, m-odvaga uzorka. MDA vrednost je izražena kao miligrami malondialdehida po kilogramu uzorka.

### 3.2.7.6. Sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida

Sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida (propanala, pentanala, heksanala, heptanala i oktanala) određen je primenom metode statičke „headspace“ gasno-hromatografske analize (SHS-GC) (Mandić *i sar.*, 2012), koja se zasniva na direktnom ubrizgavanju parne faze uzorka koji se nalazi u zatvorenom vialu. Navedene analize izvedene su korišćenjem uređaja, *Agilent 7890A GC System* (Agilent Technologies, USA) snabdevenim sistemom za unošenje uzoraka „split/splitless“, elektonskom kontrolom protoka gasa, „headspace“ autosemplerom CombiPAL System (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) i plameno-jonizacionim detektorom (FID). Za razdvajanje aldehida korišćena je hromatografska kolona DB-WAX (J&W Scientific, Agilent Technologies, USA) dužine 30 m, prečnika 0.25 mm i debljine 0.50 µm. Za hromatografsko određivanje, mereno je 2.00 g prethodno odmrznutog uzorka Petrovačke kobasice. Aldehidi prisutni u uzorcima identifikovani su poređenjem retencionih vremena pikova sa retencionim vremenom odgovarajućeg standarda (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany i Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od koncentracije standarda konstruisana je kalibraciona kriva za svaki ispitani aldehyd. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti koncentracije i površine pika izračunate su koncentracije pojedinih aldehida u ispitanim uzorcima. Rezultat je izražen kao sumarni sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida u µg/g uzorka.

### **3.2.7.7. Senzorska analiza profila mirisa i ukusa**

Senzorsku analizu mirisa i ukusa tradicionalne fermentisane suve Petrovačke kobasice obavila je grupa od 8 obučениh ocenjivača primenom metode kvantitativne deskriptivne analize. Za ocenjivanje je korišćen bod sistem od 1 do 5 (Radovanović i Popov-Raljić, 2001). Svaka ocena predstavlja određen nivo kvaliteta: 1-ekstremno intenzivan, odnosno ekstremno blag; 2-veoma intenzivan, odnosno veoma blag; 3-umereno intenzivan, odnosno umereno blag; 4-neznatno intenzivan, odnosno neznatno blag; 5-optimalan miris i ukus.

### **3.2.8. Statistička obrada podataka**

Za obradu eksperimentalnih podataka korišćeni su računarski softverski programi Microsoft Excel 7 i Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA). Svi rezultati u radu su prikazani kao srednja vrednost tri ili više nezavisnih merenja  $\pm$  SD, kao što je naznačeno u svakoj metodi. Statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti  $\pm$  SD određena je sa 95% verovatnoće ( $p < 0.05$ ) primenom analize varijanse sa jednom nezavisnom promenljivom (One way ANOVA).

#### 4. REZULTATI I DISKUSIJA

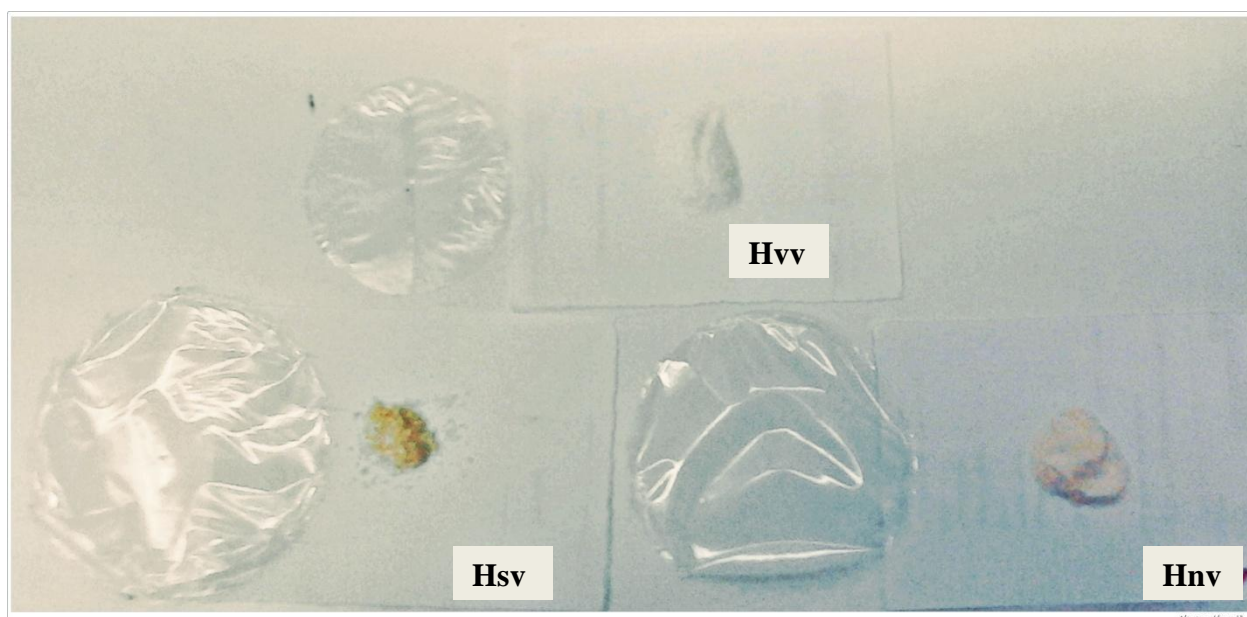
Istraživanje u okviru ove disertacije obuhvatilo razvoj biorazgradivih filmova na bazi hitozana, uz dodatak aktivnih i pratećih komponenti, sa ciljem formiranja premaza optimalnih svojstava za primenu na proizvodima od mesa u tipu fermentisane suve kobasice. Promenom koncentracije i viskoziteta hitozana, formiranjem kompozitnih filmova dodatkom polietilen oksida, variranjem količine i vrste dodate aktivne komponente (EUO i EUK), kao i dodatkom pčelinjeg voska poboljšane su karakteristike dobijenih filmova, prvenstveno fizičko-hemijske osobine, odnosno smanjena je osetljivost filma na dejstvo vlage, poboljšane su barijerne karakteristike prema vodenoj pari, kao i biološka aktivnost: antimikrobna i antioksidativna. Pored formiranja hitozanskih biofilmova razlivanjem na Petri ploče, ista filmogena emulzija je korišćena i za formiranje premaza na kolagenim omotačima, koji su nakon ove laminacije okarakterisani. Istraživanja su vođena u smeru optimizacije fizičko-mehaničkih, fizičko-hemijskih i barijernih svojstava proizvedenih filmova i laminiranih kolagenih omotača, uz praćenje promena u strukturi filma i njegovoj bioaktivnosti. Odabrani hitozanski premazi su primenjeni kao aktivni biorazgradivi jestivi premazi u funkciji zaštite i produženja održivosti fermentisane suve Petrovačke kobasice. Efekti primene aktivnog biorazgradivog hitozanskog premaza praćeni su ispitivanjem parametara kvaliteta Petrovačke kobasice tokom skladištenja. Rezultati istraživanja su podeljeni u celine:

- Karakterizacija i primena hitozanskih biofilmova sa dodatkom EUO i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača
- Karakterizacija i primena hitozanskog biofilma sa dodatkom EUK i odgovarajućeg laminiranog kolagenog omotača
- Karakterizacija i primena hitozanskih biofilmova, uz dodatak EUK i pčelinjeg voska i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača

#### 4.1. Karakterizacija i primena hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja origana i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača

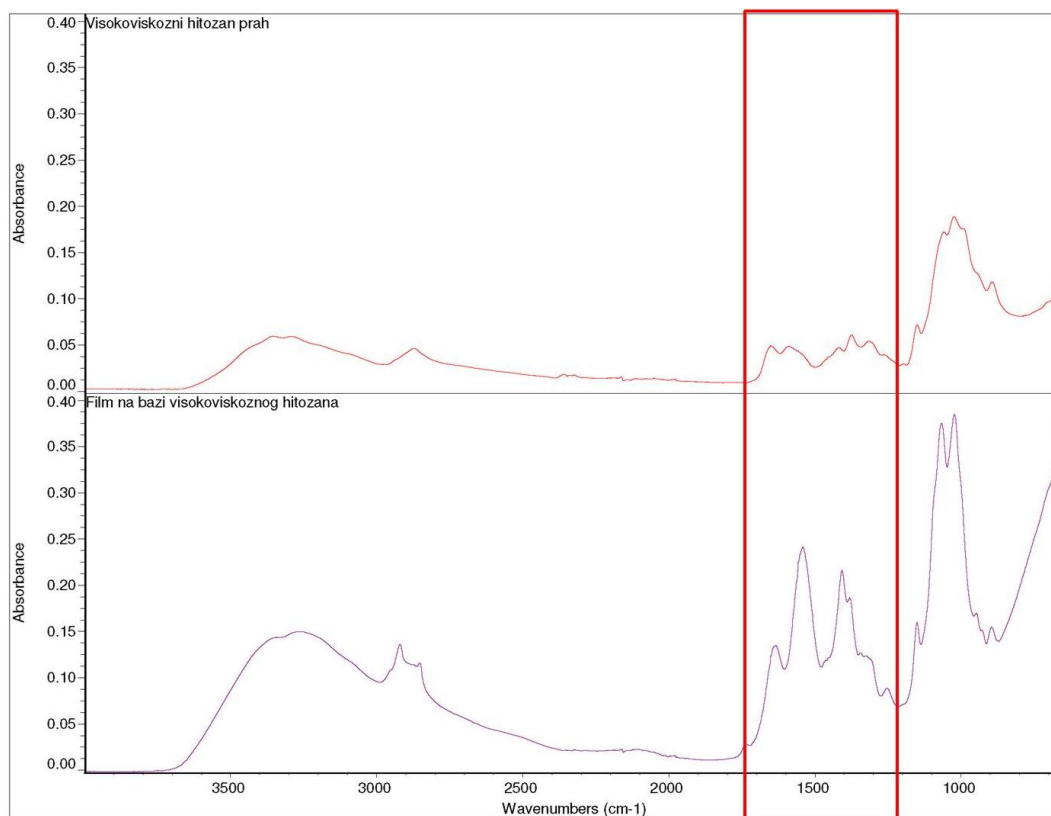
##### 4.1.1. Uticaj molekulske mase hitozana, kao i dodatka polietilenoksida na mehanička i barijerna svojstva biofilma

Hitozani različitog viskoziteta: hitozan visokog viskoziteta (Hvv), hitozan srednjeg viskoziteta (Hsv) i hitozan niskog viskoziteta (Hnv) su korišćeni za pripremu biofilmova. Ista masa filmogenog rastvora je razlivena na Petri ploče i filmovi su osušeni pri sobnim uslovima. Dobijeni filmovi se, po izgledu, nisu značajno razlikovali. Dobijeni su tanki, prozirni, sjajni filmovi, koji na dodir šuščaju, podsećajući na celofan (Slika 32).



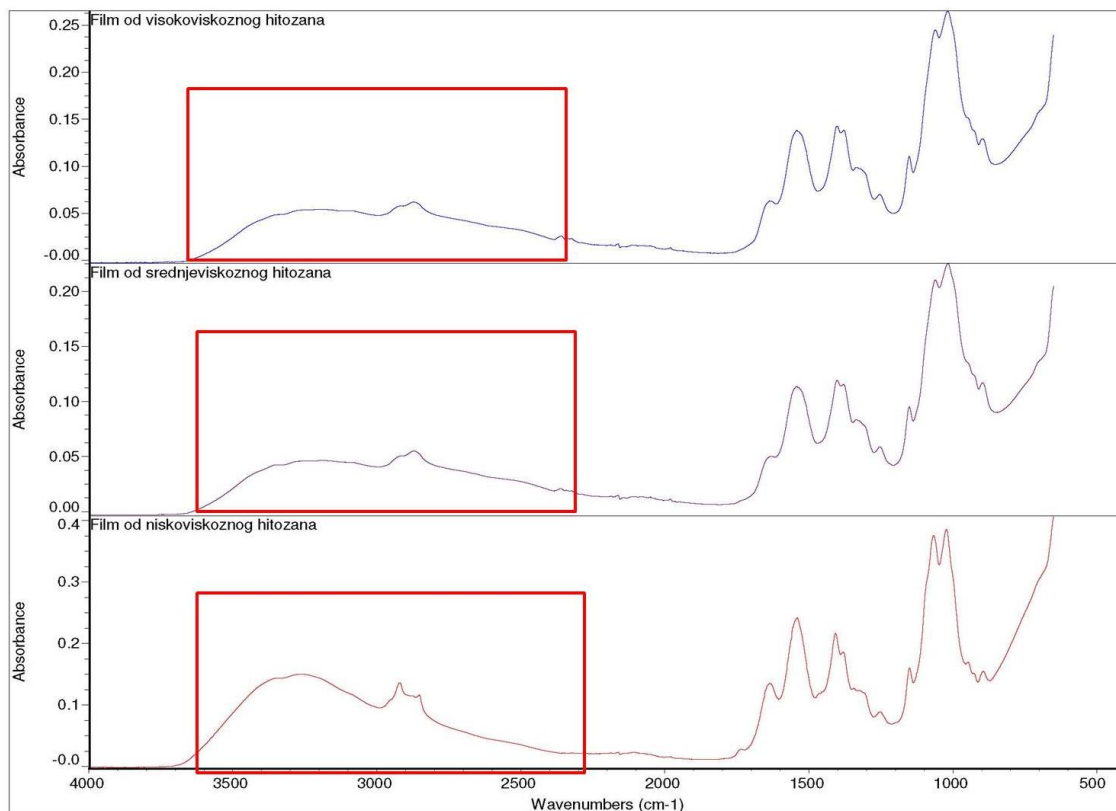
**Slika 32. Nativni hitozan visokog viskoziteta (Hvv), srednjeg viskoziteta (Hsv) i niskog viskoziteta (Hnv) i odgovarajući filmovi**

Na *Slici 33* je prikazan ATR-FTIR spektar viskoviskoznog hitozana u prahu i u filmu. Rezultati pokazuju da je rastvaranje hitozana u sirćetnoj kiselini, razlivanje i formiranje filma dovelo do strukturnih promena u nativnom hitozanu. Koeficijent korelacije spektra nativnog hitozana i hitozana u filmu je 0.6591, što ukazuje na značajne razlike u ovim spektrima. Hitozan u filmu je u obliku hitozonijum acetata, čije su grupe  $-NH_3^+$  i  $^-OOC$  okarakterisane dvema apsorpcionim trakama, na  $1539.1\text{ cm}^{-1}$  i  $1405.69\text{ cm}^{-1}$  (FTIR), koje su obeležene crveno na *Slici 33*. (Lagaron *i sar.*, 2007). U opsegu spektra od  $2500\text{ cm}^{-1}$  do  $650\text{ cm}^{-1}$ , gde je došlo do pojave pikova vezanih za hitozonijum acetat, koeficijent korelacije spektara je iznosio 0.6621, što potvrđuje značajne promene u ovom delu spektra. Ostale promene koje se uočavaju, su uglavnom posledica veće uredenosti i većeg broja vodoničnih veza u filmu i definiše ih deo spektra od  $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $2500\text{ cm}^{-1}$ , u kojem je određen koeficijent korelacije 0.5906. Do sličnih strukturnih promena dolazi i tokom formiranja filma na bazi hitozana srednjeg i niskog viskoziteta iz rastvora u sirćetnoj kiselini (Prilog 1).



Slika 33. ATR-FTIR spektri nativnog hitozana visokog viskoziteta i biofilma na bazi ovog hitozana

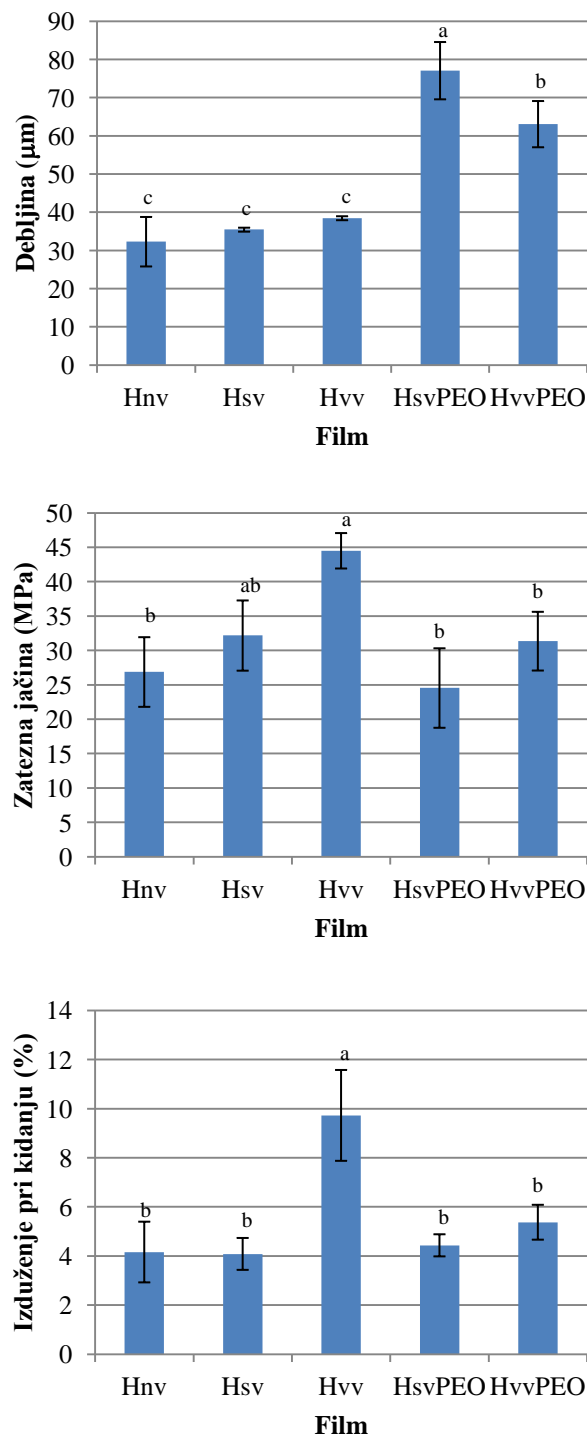
Između spektara nativnih hitozana različitih viskoziteta nije uočena razlika u strukturi (spektari dati u Prilogu 1) i određen je koeficijent korelacije spektara preko 0.9. U strukturi filmova od hitozana različitih viskoziteta, uočena je minimalna razlika u strukturi i to u opsegu spektra od 2500 cm<sup>-1</sup> do 3500 cm<sup>-1</sup>, koji opisuje vodonične veze između molekula hitozana i vibracije -CH<sub>2</sub> grupe koje su, na osnovu ATR-FTIR spektara prikazanih na *Slici 34.*, izraženije u biofilmu od hitozana visokog viskoziteta. Za film od visokoviskoznog i niskoviskoznog hitozana, koeficijent korelacije u ovom delu spektra je iznosio 0.6692, dok je poređenjem celih spektara određen koeficijent korelacije od 0.8453, što potvrđuje da se najveće razlike u spektrima nalaze u okviru navedene oblasti. Za filmove od niskoviskoznog i srednjeviskoznog hitozana određen je visok koeficijent korelacije od 0.9848 koji govori da praktično nema značajnih razlika u strukturi ova dva filma.



Slika 34. ATR-FTIR spektri biofilmova na bazi hitozana niskog, srednjeg i visokog viskoziteta

Uporedni rezultati ispitivanja fizičko-mehaničkih osobina, debljine, zatezne jačine i izduženja pri kidanju filmova na bazi hitozana različitog viskoziteta su prikazani na *Grafiku 1*. Pored čisto hitozanskih filmova, radi poboljšanja mehaničkih svojstava filmova, formirani su i filmovi sa dodatkom PEO, u odnosu hitozan:PEO, 1:1. Zivanovic *i sar.* (2007) su analizirali PEO, sintetički polimer niske cene koji se rastvara u vodi, kao potencijalno sredstvo za poboljšanje mehaničkih i barijernih svojstava filma na bazi niskoviskoznog hitozana. Njihovi rezultati su pokazali da dodatkom PEO do udela hitozan:PEO, 50:50 dolazi do sniženja zatezne jačine filma, uz minimalne promene izduženja pri kidanju, a preko ove vrednosti dolazi do smanjenja vrednosti zatezne jačine i povećanja vrednosti izduženja pri kidanju. U navedenom eksperimentu je korišćen hitozan niskog viskoziteta, dok je u okviru ove disertacije PEO dodat filmogenom rastvoru hitozana visokog i srednjeg viskoziteta, uz pretpostavku da će dugački polimerni lanci načinom pakovanja, preplitanjem i jakim vodoničnim intermolekularnim povezivanjem formirati film dobrih mehaničkih i barijernih svojstava, a da će dodatak PEO doprineti elastičnosti hitozanskih biofilmova.

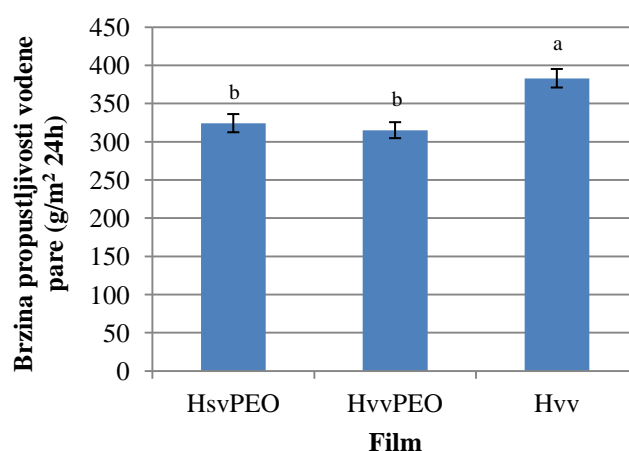




**Grafik 1. Uticaj viskoziteta hitozana i dodatka PEO na mehanička svojstva biofilma: Hnv, Hsv i Hhv su filmovi na bazi hitozana niskog, srednjeg i visokog viskoziteta, a PEO označava filmove u koje je dodat PEO. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )**

Rezultati ispitivanja su pokazali da između debljina filmova dobijenih razlivanjem iste mase filmogenog rastvora hitozana različitog viskoziteta nema značajne razlike ( $p > 0.05$ ). Sa druge strane, jačina filmova iste debljine se razlikovala. Zatezna jačina, kao i izduženje pri kidanju su bile najveće kod filma proizvedenog od hitozana velikog viskoziteta. Ovi rezultati

su u dobroj korelaciji sa literaturnim podacima za hitozanske filmove proizvedene iz polimera različitih molekulskih masa bez dodatka plastifikatora (Nunthanid *i sar.*, 2001; Park *i sar.*, 2002). Ukoliko se uporede vrednosti zateznih svojstava čisto hitozanskih filmova i filmova sa dodatkom PEO, uočava se da, slično kao i u eksperimentu Li *i sar.* (2010), dodatak PEO u odnosu 1:1 u hitozanski film srednjeg viskoziteta i visokog viskoziteta ne doprinosi boljim mehaničkim svojstvima filmova. Na osnovu analize mehaničkih svojstava biofilma, najpogodniji film za upotrebu u industriji mesa, kao premaz za proizvode od mesa u tipu suvih fermentisanih kobasica je odabran hitozanski film na bazi hitozana visokog viskoziteta. Kako je u literaturi izneto da dodatak PEO u hitozanski film može doprineti poboljšanju barijernih svojstava hitozanskog filma za vodenu paru, ispitana su ova svojstva kompozitnih filmova HsvPEO i HvvPEO i upoređena sa odabranim filmom na bazi viskoviskoznog hitozana (Zivanovic *i sar.*, 2007). Rezultati su prikazani na *Grafiku 2.*

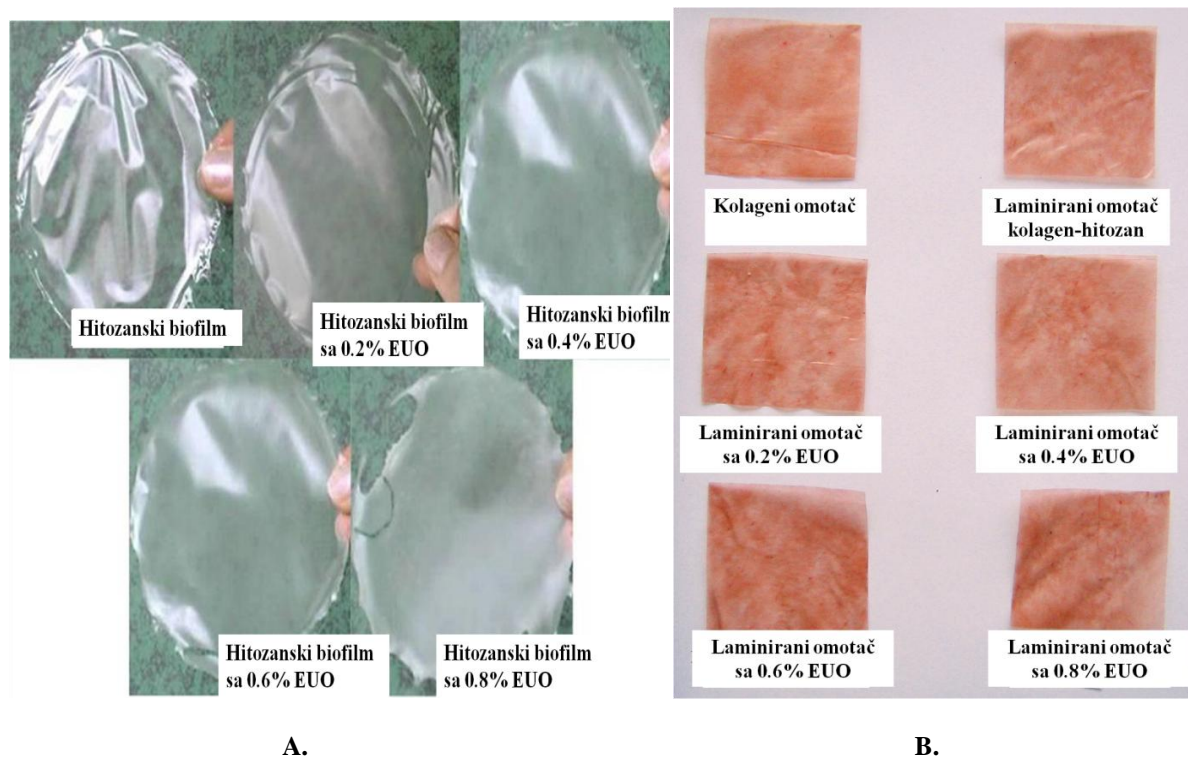


**Grafik 2. Brzina propustljivosti vodene pare (g/m<sup>2</sup> 24h) kroz hitozanski film Hvv i kompozitne filmove HsvPEO i HvvPEO. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti (p<0.05)**

Sa *Grafika 2.* se može videti da je dodatak PEO u hitozanski film doveo do smanjenja brzine propustljivosti vodene pare, ali ovo smanjenje se ne može smatrati značajnim u smislu primene i, imajući u vidu značaj mehaničkih svojstava biofilma za predviđenu primenu, hitozan visokog viskoziteta je odabran za dalju optimizaciju i proizvodnju biofilmova.

#### 4.1.2. Karakterizacija hitozanskih biofilmova uz dodatak etarskog ulja origana i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača

Na *Slici 35 (A.)* su prikazane fotografije dobijenih biofilmova od visokoviskoznog hitozana, uz dodatak rastuće koncentracije EUO, dok su na *Slici 35 (B.)* prikazani odgovarajući kolageni laminirani omotači.



Slika 35. Fotografije A. Biofilmova; B. Laminiranih kolagenih omotača

Hitozanski film bez dodatog EUO je kompaktan, savitljiv, suv, bezbojan, proziran, sjajan, a kroz film se može uočiti mrežasta vlaknasta struktura. Film ima zaostali miris na sirćetnu kiselinu. Sa dodatkom EUO, filmovi postaju mat, mutni, neprozirni, beličasti, glatki, meki, sa mirisom na origano. U literaturi je slično opisan uticaja dodatka etarskog ulja origana na izgled filma na bazi alginata, kao i uticaj dodatka polifenola zelenog čaja, ekstrakta zelenog čaja, etarskih ulja limuna i timijana na film na bazi hitozana. Transparentnost filmova je opadala sa dodatkom svih navedenih aktivnih komponenti, uz pojavu žućkastog obojenja filma (Benavides *i sar.*, 2012; Siripatrawan i Harte, 2010; Wang *i sar.*, 2013; Peng i Li 2014).

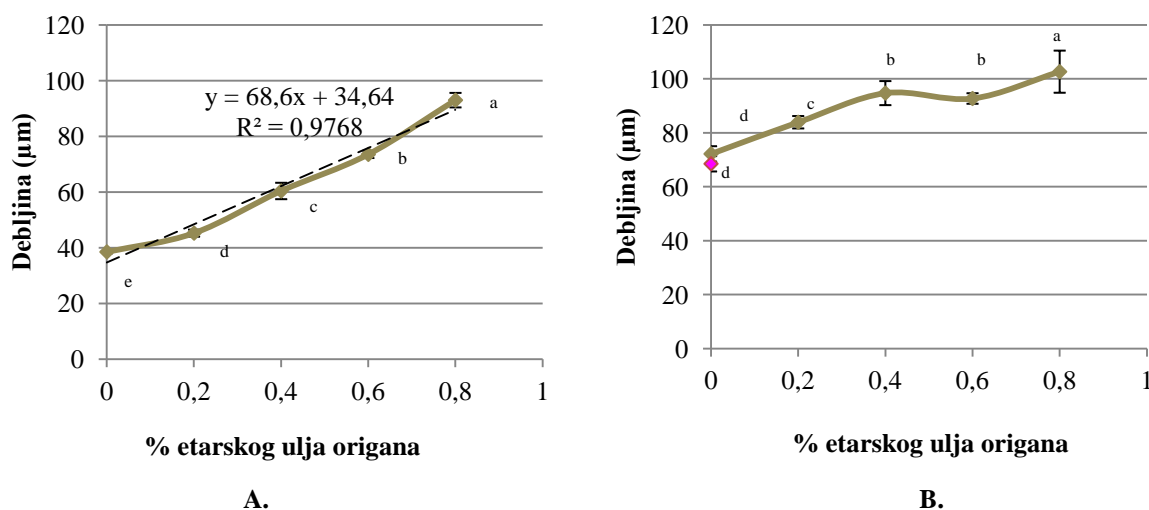
Kolageni omotač premazan samo slojem hitozana, bez dodatog ulja, je sjajni od nelaminiranog omotača, dok se ovaj sjaj, sa povećanjem procenta EUO u laminiranom sloju, gubi. U boji i transparentnosti nema uočljive razlike između laminiranih i nelaminiranog omotača. Omotač laminiran čisto hitozanskim slojem ima blag miris na sirće, dok laminirani omotači sa EUO u sloju laminata imaju slabo do srednje izražen miris na origano.

Po opisanom postupku pripreme filmova, konstatovano je da je 0.8% EUO maksimalna koncentracija ulja koja je mogla biti umešana u filmogeni rastvor da se dobije kompaktan, ravnomeran film. Sa dodatkom veće koncentracije ulja, filmovi nisu mogli biti razliveni,

skupljali su se na podlozi, te su dobijani filmovi neravnomernih oblika i debljina (ovo se delimično već uočava kod filma sa 0.8% ulja) iz kojih se tokom stajanja izdvajalo ulje, te su bili masni po površini.

### Fizičko-mehaničke karakteristike

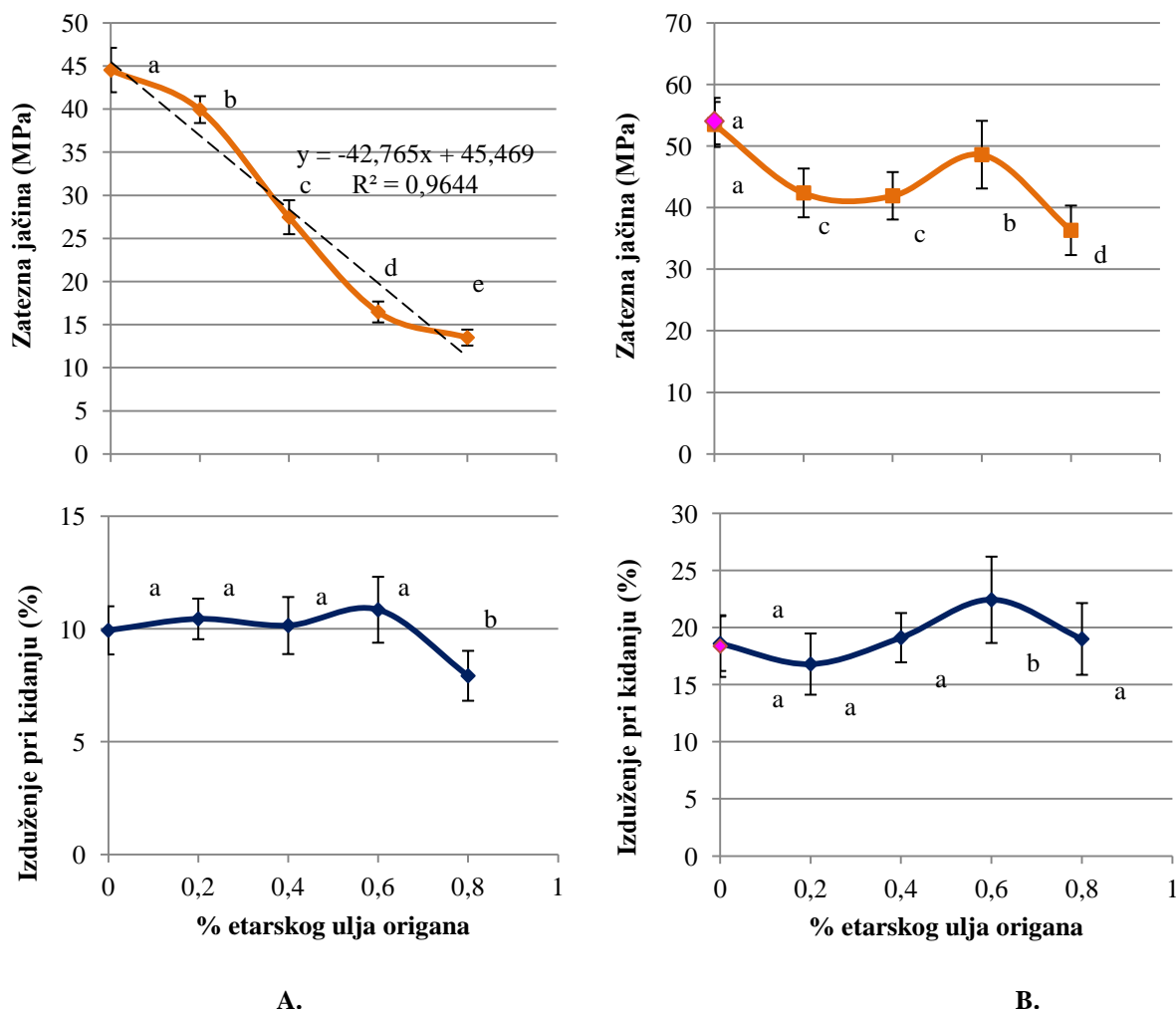
Prema opisanoj proceduri pripreme biofilмова, filmovi su dobijeni razlivanjem iste mase filmogene smeše na Petri ploče. Zbog razlike u sastavu i viskozitetu filmogenih smeša, dobijeni su filmovi koji se svi značajno razlikuju po debljinama ( $p < 0.05$ ). Sa porastom koncentracije EUO, debljina filmova raste, od  $(38.45 \pm 0.52) \mu\text{m}$ , za čisto hitozanski biofilm, do  $(92.93 \pm 2.60) \mu\text{m}$  za biofilm sa 0.8% EUO. Ovaj porast debljine se u datom opsegu koncentracije EUO može dobro ( $R^2 = 0,9768$ ) opisati linearnom funkcijom, datom na *Grafiku 3. (A)*.



**Grafik 3.** Debljina ( $\mu\text{m}$ ), u zavisnosti od koncentracije etarskog ulja origana (% v/v), A. u biofilmu B. u laminiranom kolagenom omotaču (♦ je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

Na *Grafiku 3. (B)* data je zavisnost debljine laminiranog kolagenog omotača od koncentracije EUO u hitozanskom sloju. Svi filmovi su proizvedeni na isti način, premazivanjem kolagenog omotača slojem na bazi hitozana u tri sloja. Sa porastom koncentracije EUO u hitozanskom sloju, debljina laminiranog omotača raste, od  $(68.47 \pm 2.85) \mu\text{m}$  za nelaminirani kolageni omotač,  $(72.13 \pm 2.92) \mu\text{m}$  za laminirani omotač bez EUO, do  $(102.60 \pm 4.44) \mu\text{m}$  za laminirani omotač sa 0.8% EUO. Slično kao i kod biofilмова i kod laminiranih omotača debljina raste sa porastom procenta EUO, ali ovaj porast nije tako pravilan, kao kod biofilмова. Slične vrednosti za debljinu 1% (w/v) hitozanskog filma, od  $(27 - 60) \mu\text{m}$ , prikazane su u radu Sukkunta (2005), za hitozanske filmove u mlečnoj (1%, v/v i 5%, v/v), propionskoj (1%, v/v i 5%, v/v) i limunskoj kiselini (2%, v/v i 5%, v/v). Ovi filmovi su bili formirani razlivanjem različitih zapremina filmogene smeše. Takođe, u radu Rubilar *i sar.* (2013), razlivanjem 200 mL 1.2 % (w/v) filma na bazi hitozana velike molekulske mase na Petri ploču dijametra 32 cm, dobijen je

film debljine 42  $\mu\text{m}$ . U poređenju sa drugim, često korišćenim biopolimernim filmovima iste koncentracije, debljina hitozanskih biofilmova je slična pektinskim i filmovima od karboksimetilceluloze, a značajno niža nego kod filmova od kukuruznog skroba i agara (Nguyen, 2012). Porast debljine filma sa porastom dodatog EUO je zabeležen i u radu Zivanovic *i sar.* (2005), gde je došlo do porasta debljine filma za više od tri puta pri dodatku 2 % (v/v) ulja. Slično, sa dodatkom ekstrakata zelenog čaja i ekstrakta semenki grožđa, zabeležen je porast debljine hitozanskog filma do 5 puta (Amankwaah, 2013). Porast debljine filma je zapažen i pri dodatku etarskih ulja limuna, timijana i cimeta u hitozanski film (Peng i Li, 2014). Debljina filma, pri razlivanju iste mase (zapremine) filmogenog rastvora, raste sa porastom količine rastvorenih supstanci (Amankwaah, 2013; Rubilar *i sar.*, 2013). Kako raste koncentracija dodate rastvorene supstance (etarskog ulja, ekstrakta), raste molekulska interakcija između molekula hitozana i rastvorene ili emulgovane supstance, a slabe agregacione sile između molekula polimera čineći polimerni matiks otvorenijim i na taj način se razlivanjem iste mase filmogenog rastvora dobiju filmovi značajno veće debljine (Bonilla *i sar.*, 2012).



**Grafik 4. Zatezna jačina (MPa) i izduženje pri kidanju (%) u zavisnosti od koncentracije etarskog ulja origana (% , v/v) za A. Biofilm; B. Laminirani kolageni omotač (♦ je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )**

Mehanička svojstva odražavaju mogućnost filma da zaštiti fizički integritet hrane (Martins *i sar.*, 2012; Rubilar *i sar.*, 2013). Vrednost zatezne jačine hitozanskog filma (Grafik 4, A) se nalazi u opsegu literaturnih vrednosti za slične hitozanske filmove (Nunthanid *i sar.*, 2001; Peng i Li 2014; Amankwaah 2013; Sukkunta 2005; Sébastien *i sar.*, 2006; Trung *i sar.*, 2009; Mayachiew *i sar.*, 2008; Rubilar *i sar.*, 2013). Vrednosti su više nego za filmove dobijene iz 3% (w/v) rastvora niskomolekularnog hitozana u različitim kiselinama (mravlja, sirćetna, propionska, mlečna) i sa različitom količinom dodatog plastifikatora polietilen glikola 400 (Caner *i sar.*, 1998). Dodatak EUO u hitozanski film je uticao na mehanička svojstva hitozanskog filma. Najizraženiji je uticaj na zateznu jačinu filma. Zatezna jačina se linearno smanjuje ( $R^2=0.9644$ ) sa povećanjem koncentracije ulja u filmu, kao što je prikazano na *Grafiku 4. (A)*. Vrednost zatezne jačine hitozanskog filma bez ulja bila je  $(44.51 \pm 2.58)$  MPa, za film sa 0.2% EUO  $(39.92 \pm 1.56)$  MPa, a za film sa 0.8 % EUO  $(13.48 \pm 0.92)$  MPa. Hitozanski filmovi različite koncentracije i različitog stepena deacetilovanosti hitozana, pokazali su sličnu vrednost zatezne jačine, koja se kretala oko 40 MPa (Nguyen 2012), odnosno oko 37 MPa (Pranoto *i sar.*, 2005). Rezultati za zateznu jačinu filmova sa dodatim EUO su uporedivi sa rezultatima većeg broja autora koji su u hitozanski film inkorporirali aktivne supstance koje nisu imale funkciju umrežavanja, kao: EUO, karvakrol, etarska ulja timijana, belog luka, bergamota, kalijum sorbat, nizin, ekstrakt zelenog čaja, ekstrakt semenki grožđa i oleinska kiselina (Chi 2004; Altiok *i sar.*, 2010; Sánchez-González *i sar.*, 2010; Pranoto *i sar.*, 2005; Amankwaah 2013; Vargas *i sar.*, 2009). Najverovatnije je da, povećanjem kontakta molekula hitozana i sastojaka ulja ili ekstrakta, slabe agregacione sile između polimernih lanaca, što dovodi do otvorenijeg matriksa, gubitka kohezije filma i slabljenja njegove mehaničke otpornosti (Bonilla *i sar.*, 2012; Altiok *i sar.*, 2010, Cagri *i sar.*, 2001). Takođe je izneto da dodata hidrofobna supstanca uzrokuje diskontinuitet u strukturi filma, kao i smanjenje mobilnosti polimernih lanaca, što dovodi do smanjenja fleksibilnosti i mehaničke otpornosti filma (Sánchez-González *i sar.*, 2009). Péroval *i sar.*, (2002) su pokazali da dodatak ulja u polisaharidni film dovodi do snižavanja vrednosti zatezne jačine i izduženja pri kidanju jer lipidi nemaju mogućnost formiranja kontinualnog kohezivnog matriksa. Pored navedenog, sadržaj vlage u filmu značajno utiče na mehanička svojstva. Dodatkom hidrofobne supstance smanjuje se sadržaj vlage u filmu, pa samim tim se očekuje i smanjenje plastičnosti filma, jer voda deluje kao plastifikator (Rivero *i sar.*, 2010).

Peng i Li (2014) su dobili nešto drugačije rezultate, tj. da dodatak ulja (1%, w/v) limuna, timijana i cimeta nije uticao na vrednost zatezne jačine 2% (w/v) hitozanskog filma, ili je čak doveo do porasta vrednosti ovog parametra (Peng i Li 2014; Rubilar *i sar.*, 2013). Slične rezultate su objavili Ojagh *i sar.* (2010) da je zatezna jačina hitozanskog filma porasla sa dodatkom etarskog ulja cimeta. Kako je zatezna jačina u korelaciji sa mikrostrukturom polimernog matriksa, kao i sa intermolekularnim silama unutar matriksa, to je moguće da ovo svojstvo varira u zavisnosti od vrste dodatog etarskog ulja, svojstava samog hitozana, dodatka plastifikatora i uslova emulgovanja (Atarés *i sar.*, 2010).

Sličan efekat dodatka ulja u sloj za laminiranje, zapažen je i kod laminiranog kolagenog omotača, ali je ovaj efekat bio manje izražen (Grafik 4, B). Između nelaminiranog kolagenog omotača i kolagenog omotača laminiranog čisto hitozanskim slojem, nema značajne razlike u vrednosti zatezne jačine ( $p > 0.05$ ), koja se kreće oko 55 MPa, a jačina filma potiče od kolagenog omotača. Sa dodatkom EUO u hitozanski sloj dolazi do postepenog opadanja zatezne jačine omotača, od  $(42.36 \pm 3.96)$  MPa za omotač sa 0.2% ulja do  $(36.29 \pm 4.02)$  MPa za omotač sa 0.8% ulja.

Kada je u pitanju izduženje pri kidanju, koje je mera mogućnosti istežanja filma pre nego dođe do prekidanja, generalno se može reći da dodatak EUO nije uticao značajno ( $p > 0.05$ ) na promenu ove osobine hitozanskog filma, da su vrednosti izduženja oko 10%, osim za film sa 0.8% ulja, gde je izmerena vrednost od oko 8% (Grafik 4, A). Sánchez-González *i sar.* (2010) i Ojagh *i sar.* (2010) su takođe u sličnim eksperimentima dobili smanjenje procenta izduženja filma sa dodatkom etarskog ulja bergamota i cimeta u hitozanski film.

Kod laminiranog omotača, gde su vrednosti izduženja pri kidanju oko 18% (osim za omotač sa 0.6% EUO, gde izduženje iznosi oko 22%), nije uočen jasan uticaj dodatka EUO na izduženje pri kidanju (Grafik 4, B). Vrednosti izduženja pri kidanju su u saglasnosti sa vrednostima prikazanim u radovima Sukkunta (2005), Nunthanid *i sar.* (2001), Suyatma *i sar.* (2005) i Sebastien *i sar.* (2006), značajno niže nego u radovima Caner *i sar.* (1998), Peng i Li (2014), a više nego u radovima Amankwaah (2013), Zivanović *i sar.* (2005), Altiok *i sar.* (2010). Očekivano bi bilo da sa opadanjem zatezne jačine dođe do povećanja vrednosti izduženja pri kidanju kod proizvedenih filmova, usled smanjenja interakcije između molekula polimera (Chi 2004; Bonilla *i sar.*, 2012; Amankwaah, 2013). Ovo verovatno nije bio slučaj zbog niskog procenta ulja u filmu ili male energije mešanja, te nije došlo do pravog efekta plastifikacije, već do slabljenja filma, usled gubitka kohezije. Slične rezultate su dobili i Pranoto *i sar.*, 2005, gde sa dodatkom etarskog ulja belog luka nije došlo do promene vrednosti izduženja pri kidanju hitozanskog filma, a slični rezultati su dobijeni i za film na bazi alginata sa etarskim uljem belog luka u koncentraciji (0.1 - 0.3)% (Pranoto *i sar.*, 2005, Benavides *i sar.*, 2012).

Caner *i sar.* (1998) su prikazali širok opseg izduženja pri kidanju (14 – 70)%, u zavisnosti od vremena skladištenja, prisustva i vrste plastifikatora i tipa kiseline koja se koristi za rastvaranje hitozana (Pinotti *i sar.*, 2007). Literaturne razlike u vrednostima zatezne jačine i procenta izduženja hitozanskog filma mogu se dovesti u vezu sa upotrebom hitozana različitih molekulskih masa, stepena deacetilovanosti i koncentracije, različitim tipovima i koncentraciji upotrebljenog plastifikatora, kao i različitim rastvaračima korišćenim u pripremi filmova (Nunthanid *i sar.*, 2001; Martins *i sar.*, 2012; Sánchez-González *i sar.*, 2009). Sa porastom molekulske mase, koncentracije i stepena deacetilovanosti hitozana, raste zatezna jačina, a opada izduženje pri kidanju. Ovaj efekat je posledica izraženijeg preplitanja molekula u matriksu zbog veće koncentracije ili veće

molekulske mase. Takođe, sa smanjenjem broja glomaznih acetil grupa, može doći do izraženije molekulske interakcije između lanaca polimera (Nunthanid *i sar.*, 2001).

Svi ispitivani laminirani kolageni omotači, kao i hitozanski film bez EUO i sa 0.2% EUO imaju zatezne jačine koje se mogu porediti, ili premašuju vrednosti većine komercijalnih polimernih materijala, od kojih su najčešće u upotrebi LDPE, HDPE, PP, PS, PET, PC, EVA, većina PA, PVC, dok ostali hitozanski filmovi imaju lošija svojstva. Vrednosti izduženja pri kidanju laminiranih kolagenih filmova se mogu porediti, ili premašuju vrednosti tek malog broja komercijalnih polimernih materijala: PA6,9; PA4,6; neke vrste PVC, PS, dok se hitozanski filmovi mogu porediti samo sa PA6,9 i PS, prema autoru Crompton (2011).

U poređenju sa drugim filmovima na bazi biopolimera, hitozanski filmovi, kao i laminirani kolageni omotači, imaju vrednosti zatezne jačine koje su uporedive sa zateznim jačinama filmova na bazi alginata, kompozita alginata i skroba i skroba sa visokim sadržajem amiloze, dok su ove vrednosti iznad vrednosti za mnoge skrobne i proteinske filmove od soje, sočiva, surutke, graška, filmove na bazi agara, pektina, karagenana, karboksimetilceluloze (Kunte *i sar.*, 1997; Pérez-Gago *i sar.*, 1999; Choi i Han, 2001; Bamdad *i sar.*, 2006; Torres *i sar.*, 2011; Nguyen, 2012), a ispod vrednosti za želatinski film i kompozitni film želatin/pogača uljane tikve (Popović, 2013).

Vrednosti izduženja pri kidanju su uporedivi sa vrednostima skrobnih, kompozitnog sago skrob-alginat filma, želatinskog i kompozitnog filma želatin/pogača uljane tikve sa niskim procentom plastifikatora u filmu, agarskih, pektinskih, karagenanskih, karboksimetil celuloznih filmova Izduženje je značajno veće nego kod filmova na bazi kukuruznog skroba, a značajno manje nego kod želatinskog filma (Popović, 2013; Fazilah *i sar.*, 2011; Bertuzzi *i sar.*, 2012; Benavides *i sar.*, 2012; Nguyen, 2012).

### **Fizičko-hemijske karakteristike**

Fizičko-hemijske karakteristike koje su analizirane, ravnotežni sadržaj vlage, sposobnost bubrenja i rastvorljivost opisuju osetljivost filmova i laminiranih omotača na dejstvo vlage. Ova svojstva filma su od velikog značaja jer utiču na biorazgradivost filma koji se koristi kao ambalažni materijal (Gnanasambadam *i sar.*, 1997). U nekim slučajevima je velika osetljivost prema dejstvu vlage poželjna, posebno ukoliko je u pitanju jestivi film koji je namenjen za konzumaciju zajedno sa upakovanim proizvodom, dok je u drugom slučaju, kada se jestivi film koristi za pakovanje hrane sa visokim sadržajem vlage, potrebna što manja osetljivost na vlagu (Rhim *i sar.*, 1998; Amankwaah, 2013). Bubrenje i rastvorljivost hitozanskog filma su povezani sa difuzijom vode, jonizacijom amino i karboksilnih grupa, disocijacijom vodoničnih i jonskih veza i relaksacijom polimera u prisustvu vlage (Mathew *i sar.*, 2006).

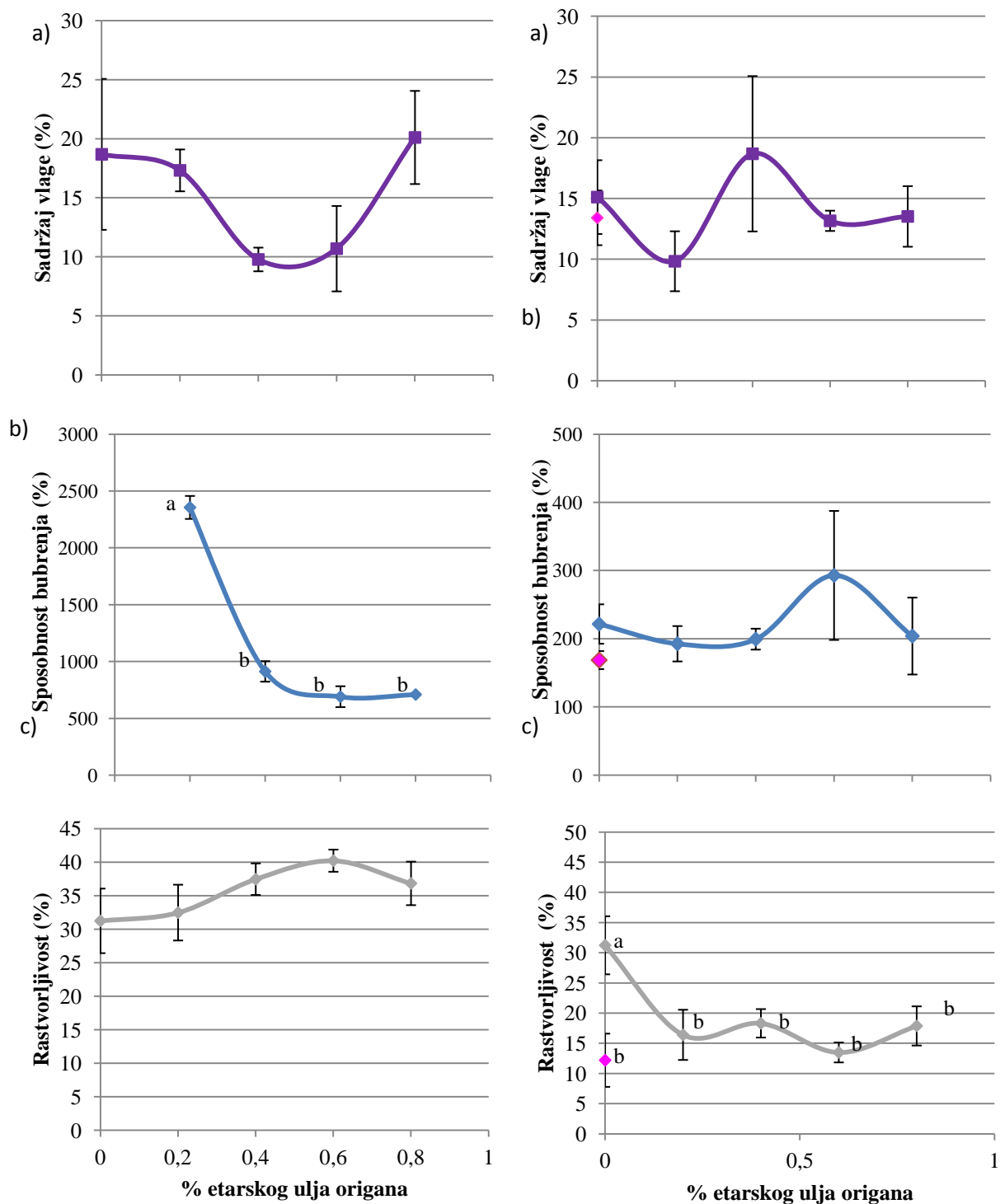


Sadržaj vlage u ispitivanim filmovima i omotačima je prikazan na *Grafiku 5. (a)*. Za hitozanski film sadržaj vlage je iznosio oko 20%, a za laminirani omotač oko 15% (koliki je sadržaj vlage i samog kolagenog omotača). Sa dodatkom EUO je došlo do promene sadržaja vlage, ali ova promena nije statistički značajna kod biofilmova, kao ni kod laminiranih omotača. Slične vrednosti sadržaja vlage u hitozanskom filmu, oko 20% dobili su Ojagh *i sar.* (2010). U radu ovih autora je prikazano smanjenje sadržaja vlage u filmovima kojima je dodata rastuća koncentracija etarskog ulja cimeta, od 0.4% do 2%. Do smanjenja sadržaja vlage u navedenom radu je došlo nakon dodatka veće koncentracije EUO (0.8% i više), što može biti objašnjenje zašto u rezultatima prikazanim na *Grafiku 5. (a)* nije uočeno smanjenje sadržaja vlage pri dodatku EUO jer je potrebno dodati veću koncentraciju etarskog ulja. U radu Mayachiew i Devahastin (2008), prikazan je sadržaj vlage od 17.9% za filmove sušene na 30°C, što je najbližije uslovima sušenja u ovom radu, dok su sušenjem na višim temperaturama dobijeni filmovi nižeg ravnotežnog sadržaja vlage. Sa dodatkom ekstrakta zelenog čaja, utvrđen sadržaj vlage hitozanskog filma od 31.53 %, je opadao, ali je dodatak hidrofobne komponente bio značajno veći nego u ovom radu: (5 – 15)% (Amankwaah, 2013).

Sposobnost bubrenja u vodi govori o osetljivosti filma na dejstvo vlage. Prema Cervera *i sar.* (2004) hitozan ima tri osnovna mesta vezivanja vode: hidroksipropil grupu, amino grupu i kraj polimernog lanca, koji može biti hidroksil grupa ili aldehidna grupa (Vargas *i sar.*, 2009). Rezultati za sposobnost bubrenja su prikazani na *Grafiku 5. (b)*. Za hitozanski film bez ulja nije bilo moguće izmeriti sposobnost bubrenja, jer je pri uslovima testa došlo do rastvaranja filma. Kod filma sa 0.2% EUO, izmerena je sposobnost bubrenja od 2355.3%. Sa daljim dodatkom ulja, 0.4%, sposobnost bubrenja je opala 2.5 puta, na 912.1%, odnosno na oko 700 % za filmove sa 0.6% i 0.8% ulja. Sniženje sposobnosti bubrenja filma u vodi je, najverovatnije, posledica hidrofobne prirode dodatog EUO. Slični rezultati su dati u radu Chi (2004) za apsorpciju vlage 1% (w/v) hitozanskog filma sa dodatim (1 – 4)% EUO. Visoke vrednosti sposobnosti bubrenja hitozanskog filma (preko 2500%) su u skladu sa literaturnim podacima (Bonina *i sar.*, 2004; Bergera *i sar.*, 2004; Nadarajah, 2005). Za kolageni nelaminirani omotač, sposobnost bubrenja je iznosila 168.6%. Laminiranjem je došlo do povećanja vrednosti ovog parametra, ali ova razlika nije bila statistički značajna, najverovatnije usled male debljine sloja laminata u odnosu na debljinu kolagenog filma, kao i zbog činjenice da sada hitozanski sloj ima jednu stranu u kontaktu sa vodom, dok je druga strana „zaštićena“ kolagenim omotačem.

Još jedna osobina koja se koristi za analizu osetljivosti filma na dejstvo vlage je rastvorljivost filma u vodi (*Grafik 5, c*). Rastvorljivost hitozanskog filma je iznosila 31.2% i, sa dodatkom EUO, nije došlo do statistički značajne promene ovog parametra. Kod laminiranog omotača, laminiranjem hitozanskim slojem je došlo do promene rastvorljivosti kolagenog omotača, sa 12.2%, za kolageni omotač, na 31.2%, za kolageni omotač sa slojem hitozana. Dodatkom EUO u laminirani sloj, vrednost rastvorljivosti se

vraća na vrednosti bliske rastvorljivosti kolagenog omotača i povećanjem koncentracije dodatog EUO ovaj parameter ostaje nepromenjen.



A.

B.

**Grafik 5. Fizičko-hemijske karakteristike A. biofilma; B. Laminiranog kolagenog omotača u zavisnosti od koncentracije etarskog ulja origana (% v/v): a) Sadržaj vlage (%); b) Sposobnost bubrenja (%); c) Rastvorljivost (%) (♦ je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).**

Vrednosti za rastvorljivost hitozanskog filma prikazane u ovom radu uporedive su sa rezultatima prikazanim u radu Nadarajah (2005), Kim *i sar.* (2006), Rubilar *i sar.* (2013), Wang *i sar.* (2013), Amankwaah (2013), Ojagh *i sar.*, (2010) za filmove sličnog sastava. Promene vrednosti za rastvorljivost hitozanskog filma sa dodatkom hidrofobne komponente, koje se sreću u literaturi su različite. U najvećem broju radova, sa dodatkom etarskih ulja (cimeta, limuna) ili ekstrakata (zelenog čaja ili semenki grožđa) došlo je do smanjenja rastvorljivosti hitozanskog filma (Rubilar *i sar.*, 2013; Ojagh *i sar.*, 2010; Amankwaah, 2013; Peng i Li, 2014), dok je u nekim radovima prikazan porast rastvorljivosti sa dodatkom polifenola zelenog čaja ili gela aloe vera (Wang *i sar.*, 2013; Khoshgozaran-Abras *i sar.*, 2012). U radovima u kojima je prikazano smanjenje rastvorljivosti dodatkom aktivne hidrofobne komponente, koncentracija dodate komponente pri kojoj je došlo do smanjenja rastvorljivosti je veća nego u ovom radu, a uslovi umešavanja i formiranja emulzije su daleko intenzivniji nego u ovom radu. Pored povećanja hidrofobnosti matriksa, smanjenje bubrenja i rastvorljivosti se može tumačiti i kao povećanje reakcije umrežavanja između hitozana i etarskih ulja (Peng i Li, 2014).

Moguće je da bi sa povećanjem koncentracije EUO, kao i sa promenom uslova emulgovanja ulja u filmogenom rastvoru hitozana došlo i do smanjenja osetljivosti filma i laminiranog omotača na vlagu. U odnosu na druge biopolimerne filmove: na bazi agara, pektina, karagenana, karboksimetil celuloze i želatina, hitozanski ispitivani filmovi su pokazali niske vrednosti za rastvorljivost, ispod 40% (Nguyen 2012).

**Tabela 9. Koordinate svetloće ( $L^*$ ), udela crvene ( $a^*$ ), udela žute boje ( $b^*$ ) i ukupna razlika boje ( $\Delta E$ ) biofilmova i laminiranih omotača**

	% etarskog ulja origana	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
Hitozanski biofilm	0	88.85±1.11 <sup>a</sup>	-0.33±0.28 <sup>b</sup>	4.91±0.54 <sup>d</sup>	8.56±0.86 <sup>d</sup>
	0.2	81.35±0.60 <sup>b</sup>	0.09±0.11 <sup>b</sup>	11.15±0.77 <sup>c</sup>	18.03±0.13 <sup>c</sup>
	0.4	73.68±0.59 <sup>c</sup>	2.18±0.18 <sup>a</sup>	14.37±0.94 <sup>bc</sup>	26.39±0.06 <sup>b</sup>
	0.6	65.28±5.02 <sup>d</sup>	3.33±1.65 <sup>a</sup>	17.49±2.15 <sup>ab</sup>	35.54±3.36 <sup>a</sup>
	0.8	64.05±1.29 <sup>d</sup>	3.87±0.32 <sup>a</sup>	19.01±2.31 <sup>a</sup>	37.23±0.07 <sup>a</sup>
Kolageni omotač	-	72.23±0.37 <sup>a</sup>	0.13±0.12 <sup>c</sup>	20.11±0.39 <sup>a</sup>	30.58±0.07 <sup>b</sup>
Laminirani kolageni omotač	0	71.19±0.36 <sup>a</sup>	0.32±0.07 <sup>c</sup>	18.03±0.34 <sup>b</sup>	30.27±0.12 <sup>b</sup>
	0.2	70.53±0.48 <sup>a</sup>	0.85±0.27 <sup>b</sup>	18.27±1.06 <sup>b</sup>	30.98±0.16 <sup>b</sup>
	0.4	68.30±0.53 <sup>b</sup>	0.93±0.08 <sup>ab</sup>	18.04±0.62 <sup>b</sup>	32.78±0.16 <sup>a</sup>
	0.6	68.67±1.21 <sup>b</sup>	1.41±0.16 <sup>a</sup>	18.96±0.31 <sup>ab</sup>	32.94±0.87 <sup>a</sup>
	0.8	67.70±0.48 <sup>b</sup>	1.18±0.28 <sup>ab</sup>	17.98±0.75 <sup>b</sup>	33.28±0.05 <sup>a</sup>

Različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

Sa dodatkom EUO došlo je do smanjenja svetloće ( $L^*$ ) hitozanskog biofilma sa 88.85, za hitozanski biofilm, na 64.05, za film sa 0.8% EUO. Filmovi su prešli iz zone zelene boje ( $a^* = -0.33$ ) u zonu crvene boje ( $a^* = 3.87$  za film sa 0.8% EUO), a udeo žute

boje ( $b^*$ ) se povećao od 4.91, za hitozanski film bez ulja, na 19.01 za hitozanski film sa 0.8% EUO. Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ ) je postepeno rasla sa dodatkom sve veće koncentracije EUO od 8.56, za hitozanski film bez ulja, do 37.23, za film sa 0.8% ulja. Ova promena je golim okom uočena kao smanjenje transparentnosti hitozanskog filma koji je postao mlečan, opalescentan, beličasto-žućkast. Ovakva promena boje filma je nepoželjna sa stanovišta upotrebe, jer mutan, beličasto-žućkast film može uticati na promenu percepcije boje upakovanog proizvoda.

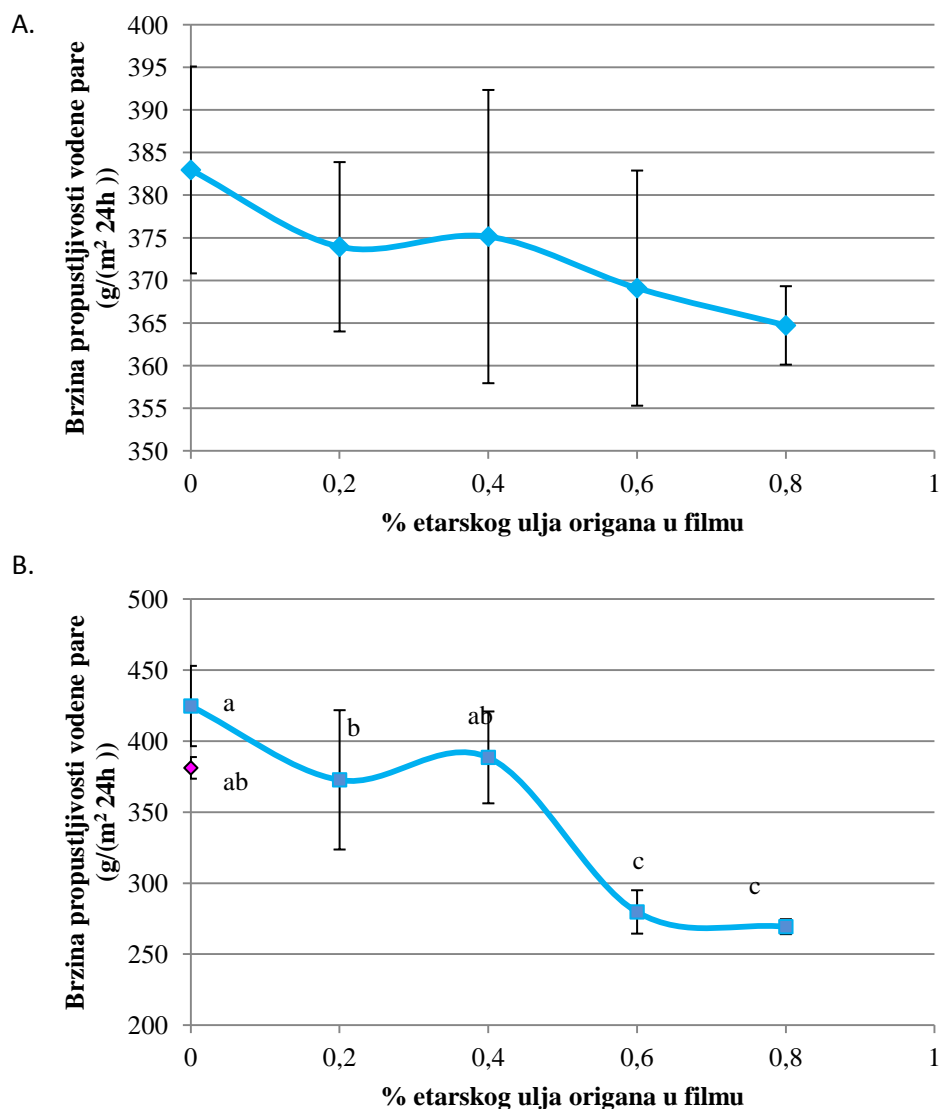
Laminacijom kolagenog filma došlo je do umerenog smanjenja svetloće ( $L^*$ ) kolagenog omotača, sa 72.23, za kolageni omotač, na 67.70, za laminirani omotač sa 0.8% EUO. Uporedo sa ovom promenom, došlo je do smanjenja udela žute boje, sa 20.11 na 17.98 i do povećanja udela crvene boje, sa 0.13 na 1.18. Posmatrano preko ukupne razlike u boji ( $\Delta E$ ), došlo je do promene ovog parametra sa 30.58 na 33.28, ali je ova promena daleko manje izražena nego u slučaju biofilmova. Promene boje izazvana laminacijom kolagenog omotača nisu detektovane golim okom, osim što je uočeno da je kolageni omotač laminiran hitozanskim slojem bez dodatog EUO sjajniji od nelaminiranog kolagenog omotača. Ovo je razumljivo kada se uzme u obzir da su promene parametra  $\Delta E$ , koje iznose ispod 3.0, teško uočljive golim okom (Nadarajah 2005). Zato se može reći da je uticaj laminacije na boju kolagenog omotača minimalan.

Za čist hitozanski film, izmereni parametri boje su u saglasnosti sa vrednostima koje su dali Li *i sar.* za 1% (w/v) hitozanski film na bazi hitozana male molekulske mase i Oguzlu i Tihminlioglu (2010) za 3% (w/v) hitozanski film. Parametar  $a^*$  za hitozanski film ima vrednost blizu nule, što ukazuje na neutralnost filma u opsegu zelene i crvene obojenosti (Nadarajah, 2005).

Sličan trend promene boje hitozanskog filma prikazan je i za hitozanski film sa dodatkom etarskog ulja belog luka, kalijum sorbata i nizina, gde je, sa početne vrednosti  $\Delta E$  od 9.28, vrednost porasla do 25.19, dodatkom aktivne supstance (Pranoto *i sar.*, 2005). Porast vrednosti  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  i  $\Delta E$  je dat i u radovima u kojima je u film na bazi alginata dodavano EUO ili etarsko ulje belog luka, kao i kod hitozanskog filma sa dodatim fenolima ili ekstraktom zelenog čaja, etarskog ulja limuna, timijana, cimeta (Benavides *i sar.*, 2012; Siripatrawan i Harte, 2010; Wang *i sar.*, 2013; Peng i Li, 2014; Ojagh *i sar.*, 2010). Razlika u boji filma zavisi od vrste i stanja dodate aktivne komponente i unutrašnje strukture koja se formira tokom sušenja filma sa dodatom aktivnom komponentom (Villalobos *i sar.*, 2005). Intenzitet promene boje zavisi od vrste i količine dodate aktivne supstance, pa su dobijeni rezultati reda veličine koji je približan efektu dodatka etarskog ulja limuna, timijana i karvakola, a daleko manji od efekta dodatka polifenola zelenog čaja.

## Barijerna svojstva

Brzina propustljivosti vodene pare kroz hidrofilni film zavisi od rastvorljivosti i difuzije molekula vode u matriksu filma (Zivanovic *i sar.*, 2007; Gontard i Guilbert, 1994). Na *Grafiku 6.* su date propustljivosti vodene pare za ispitivane hitozanske biofilmove (*Grafik 6., A*) i laminirane kolagene omotače (*Grafik 6., B*).



**Grafik 6.** Propustljivost vodene pare (g/(m<sup>2</sup> 24h KPa)) A. biofilma; B. laminiranog kolagenog omotača u zavisnosti od koncentracije etarskog ulja origana (% v/v) (♦ je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti (p<0.05).

Srednja vrednost brzine propustljivosti hitozanskog filma za vodenu paru iznosila je 222.24 g/(m<sup>2</sup> 24h KPa) ili  $9.9 \cdot 10^{-11}$  g/(m s Pa), radi poređenja sa drugim literaturnim podacima. Različite vrednosti ovog parametra su prikazane u literaturi, u zavisnosti od molekulske mase, stepena deacetilovanosti hitozana, vrste i količine plastifikatora i postupka proizvodnje filma (Wang *i sar.*, 2013; Siripatrawan i Harte, 2010; Park i Zhao, 2004). Wang *i sar.* (2013) i Siripatrawan i Harte (2010) su prikazali rezultate za brzinu

propustljivosti vodene pare hitozanskog filma od  $13.8 \cdot 10^{-11}$  i  $7.11 \cdot 10^{-11}$  g/(m s Pa). Literaturne vrednosti brzine propustljivosti za vodenu paru za hitozanski biofilm, koje su u najbližoj saglasnosti sa prikazanim rezultatima na *Grafiku 6 (A)*, iznose oko  $9.9 \cdot 10^{-11}$  g/(m s Pa), kod autora: Sebti *i sar.* (2007), Mayachiew i Devahastin (2008), Rivero *i sar.* (2009), Rivero *i sar.* (2009), Amankwaah (2013) i Pinotti *i sar.* (2007). U poređenju sa drugim biopolimernim filmovima, hitozanski filmovi imaju nižu propustljivost za vodenu paru u odnosu na biofilmove na bazi 3% kukuruznog skroba, skroba od slatkog krompira, 5% želatina, 4% karagenana, nekih zeinskih filmova (zavisno od načina proizvodnje, vrednosti se kreću od  $1.2 \cdot 10^{-11}$  g/(m s Pa) do  $124 \cdot 10^{-11}$  g/(m s Pa)), pšeničnog glutena i hidroksipropilmetilceluloze (Tabela 10). Metilcelulozni i neki zeinski filmovi imaju brzinu propustljivosti vodene pare u nivou ispitivanih hitozanskih biofilmova. U odnosu na komercijalne polimerne materijale, propustljivost hitozanskog filma za vodenu paru je reda veličine kao celofanski film ( $8.4 \cdot 10^{-11}$  (g/m s Pa)), što je i očekivano, obzirom na sličnost strukture dva polimera, a značajno niža od vrednosti ovog parametra za LDPE i HDPE, kao što se može videti u *Tabeli 10*. (Nguyen, 2012; Shellhammer i Krochta, 1997).

**Tabela 10. Brzina propustljivosti vodene pare za pojedine biofilmove i komercijalne polimerne materijale (Pinotti *i sar.*, 2007)**

Sastav filma	WVP ( $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )
Pšenični gluten sa glicerolom	$7.00 \cdot 10^{-10}$
Kukuruzni zein sa glicerolom	$8.90 \cdot 10^{-10}$
Proteini surutke sa sorbitolom	$7.17 \cdot 10^{-10}$
Kukuruzni skrob sa sorbitolom	$1.75 \cdot 10^{-10}$
Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)	$1.90 \cdot 10^{-10}$
Metilceluloza	$8.70 \cdot 10^{-11}$
Metilceluloza 1%	$7.55 \cdot 10^{-11}$
Metilceluloza 3%	$8.4-12.1 \cdot 10^{-11}$
Hitozan 2% (nepoznatog porekla)	$3.66-4.80 \cdot 10^{-11}$
Hitozan 3%	$6.19-15.27 \cdot 10^{-11}$
Hitozan 1%	$9.03 \cdot 10^{-11}$
Celofan	$8.4 \cdot 10^{-11}$
LDPE	$9.14 \cdot 10^{-13}$
HDPE	$2.31 \cdot 10^{-13}$
PA 6	$2.09 \cdot 10^{-9}$

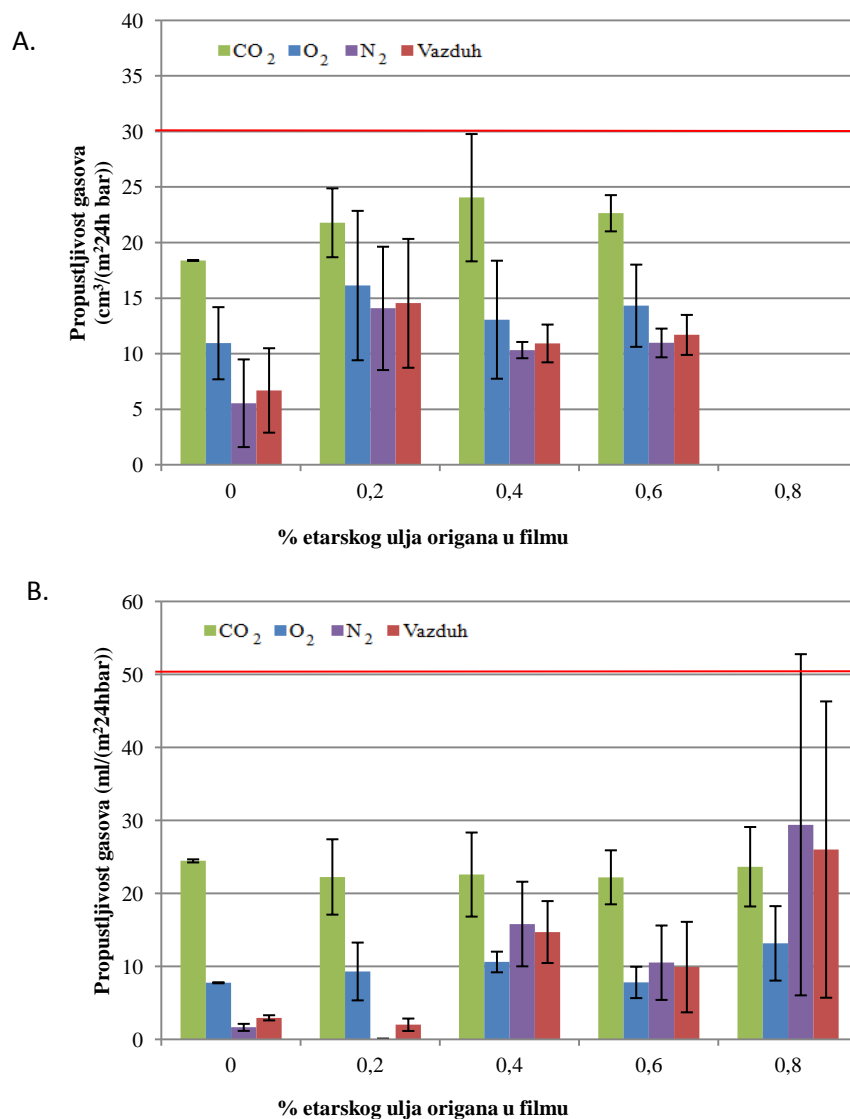
Dobijeni rezultati pokazuju da, sa dodatkom EUO, nije došlo do promene brzine propustljivosti vodene pare hitozanskih biofilmova. Za nelaminirani kolageni omotač srednja vrednost propustljivosti vodene pare je iznosila  $217.28 \text{ g}/(\text{m}^2 \text{ 24h KPa})$ , za omotač laminiran slojem hitozana  $242.10 \text{ g}/(\text{m}^2 \text{ 24h KPa})$ , a sa dodatkom EUO u laminirani sloj dolazi do smanjenja vrednosti na  $159.47 \text{ g}/(\text{m}^2 \text{ 24h KPa})$ , za film sa 0.6% EUO i  $153.57 \text{ g}/(\text{m}^2 \text{ 24h KPa})$ , za film sa 0.8% EUO. Mnogobrojni faktori utiču na ovo svojstvo biofilmova. McHugh *i sar.* (1993) su prikazali pozitivnu korelaciju između debljine filma i njene propustljivosti vodene pare, jer velika debljina filma može povećati relativnu vlažnost u blizini filma i izmeniti kinetiku apsorpcije vlage (McHugh *i sar.* 1993; Crank, 1975). Pored efekta veće debljine filma, moguće je da dodato EUO dovodi do slabljenja međumolekularne interakcije između molekula polimera, dovodeći do opuštanja i

smanjenja kompaktnosti strukture filma, što može dovesti do povećane difuzivnosti molekula vode kroz film, te veće propustljivosti vodene pare. Sa druge strane, dodatak hidrofobne supstance u film povećava hidrofobni karakter matriksa filma, povećava se gustina i smanjuje međuprostor u matriksu, a između hidrofobne supstance i hitozana može doći do interakcije koja će smanjiti broj dostupnih hidroksilnih grupa, što sve vodi smanjenju propustljivosti vodene pare. (Siripatrawan i Harte 2010; Wang *i sar.*, 2013; Park *i sar.*, 2004; Gómez-Guillén *i sar.*, 2007; Amankwaah 2013; Pranoto *i sar.*, 2005; Chi 2004). U zavisnosti od toga koji od navedenih uticaja dominira kod određenog filma, sa dodatkom etarskog ulja u hidrofilni film može doći do povećanja propustljivosti za vodenu paru ili smanjenja propustljivosti (što je slučaj kod laminiranih omotača). Ukoliko su ovi različiti efekti izbalansirani, propustljivost za vodenu paru može ostati nepromenjena sa dodatkom hidrofobne supstance u film, kao kod ispitivanih biofilmova.

**Propustljivost gasova**, a posebno propustljivost kiseonika su osobine koje imaju veliki značaj za očuvanje upakovane hrane, jer je kiseonik gas koji je ključni faktor u oksidaciji i inicijator većeg broja neželjenih promena u hrani (Sothornvit i Pitak, 2007). Propustljivost filma za ostale gasove je takođe bitna u primeni filmova, a prvenstveno u dizajniranju pakovanja u modifikovanoj atmosferi. Polisaharidni filmovi su poznati kao dobra barijera za kiseonik, zahvaljujući tesnom pakovanju i raspoređivanju molekula uz formiranje mreže vodoničnih veza (Martins *i sar.*, 2012; Bourbon *i sar.*, 2011; Cerqueira *i sar.*, 2009, Rubilar *i sar.*, 2013).

Na *Grafiku 7.* je prikazana propustljivost hitozanskih biofilmova (*Grafik 7, A*) i laminiranih kolagenih omotača (*Grafik 7, B*) sa dodatkom EUO za ugljendioksid, kiseonik, azot i vazduh. Propustljivost hitozanskog filma je iznosila 18.4 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) za CO<sub>2</sub>, 10.95 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) za O<sub>2</sub>, 5.55 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) za N<sub>2</sub> i 6.7 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) za vazduh. Vrednosti za propustljivost hitozanskog filma su uporedive sa rezultatima Di pierro *i sar.* (2006) i Altiok *i sar.* (2010). U odnosu na neke proteinske i kompozitne filmove (*Tabela 11*), propustljivost hitozanskog filma je u rangu propustljivosti ovih filmova ili niža. Ako se uporedi propustljivost hitozanskog biofilma sa propustljivošću polimernih ambalažnih materijala koji se koriste komercijalno za pakovanje hrane, propustljivost hitozanskog filma je u rangu visokobarijernih filmova namenjenih za pakovanje u vakuumu i modifikovanoj atmosferi (*Tabela 11*).

Sa dodatkom EUO nije došlo do promene propusljivosti hitozanskog filma za gasove. Za film sa 0.8% EUO nije bilo moguće odrediti propustljivost za gasove navedenom metodom zbog lošijih mehaničkih svojstava filma. U literaturi se sreću rezultati koji ukazuju najčešće na povećanje propustljivosti gasova pri dodatku hidrofobne materije u film usled mikrostrukturnih promena u filmu, koji sa dodatkom etarskog ulja postaje porozan (Altiok *i sar.*, 2010). U radu Rubilar *i sar.* (2013) je takođe zapažen ovaj efekat, ali tek pri dodatku veće koncentracije hidrofobne supstance.



**Grafik 7. Propustljivost za gasove (mL/(m<sup>2</sup> 24h bar)) kod A. biofilma; B. laminiranog kolagenog omotača, u zavisnosti od koncentracije etarskog ulja origana (% v/v) (♦ je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju.**

Rezultati za laminirane omotače su pokazali da među njima takođe nije uočena razlika u propustljivosti za gasove i propustljivost svih gasova je nivou propustljivosti hitozanskih biofilmova. Propustljivost nelaminiranog kolagenog materijala nije prikazana na *Grafiku 7. (B)* zbog preglednosti grafika, jer je propustljivost ovog omotača iznosila 25.44 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) za CO<sub>2</sub>, 2518.796 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) za O<sub>2</sub>, 7856.2 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) N<sub>2</sub> i 6726.06 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) za vazduh, što je u saglasnosti sa prirodom materijala. Laminacijom kolagenog omotača, propustljivost za gasove (osim za CO<sub>2</sub>) je smanjena više od 200 puta.



**Tabela 11. Propustljivost nekih biofilmova i komercijalnih polimernih materijalča za gasove(Lazić i sar., 2010; Popović, 2013; Parra i sar., 2010; García-Esteban i sar., 2004)**

Film	Propustljivost gasova (mL/(m <sup>2</sup> 24h bar))			
	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	Vazduh
Kompozitni film na bazi pogače uljane tikve golice	42.20	12.10	11.70	11.80
Film na bazi proteiskog izolata pogače uljane tikve golice	20.88	15.85	0	3.32
PE (90µm)	7350.40	2431.20	573.00	949.40
BOPP (40mm)	2997.90	1130.80	257.50	442.80
PVDC/BOPP(20mm)/PE(20mm)	87.00	25.30	11.70	14.06
PA/PE	-	38	-	-
Sedmoslojni visokobarijerni materijal PE/ PE/PA/EVOH alloy/PA/PE/EVA, 140 µm	-	8.3	-	-

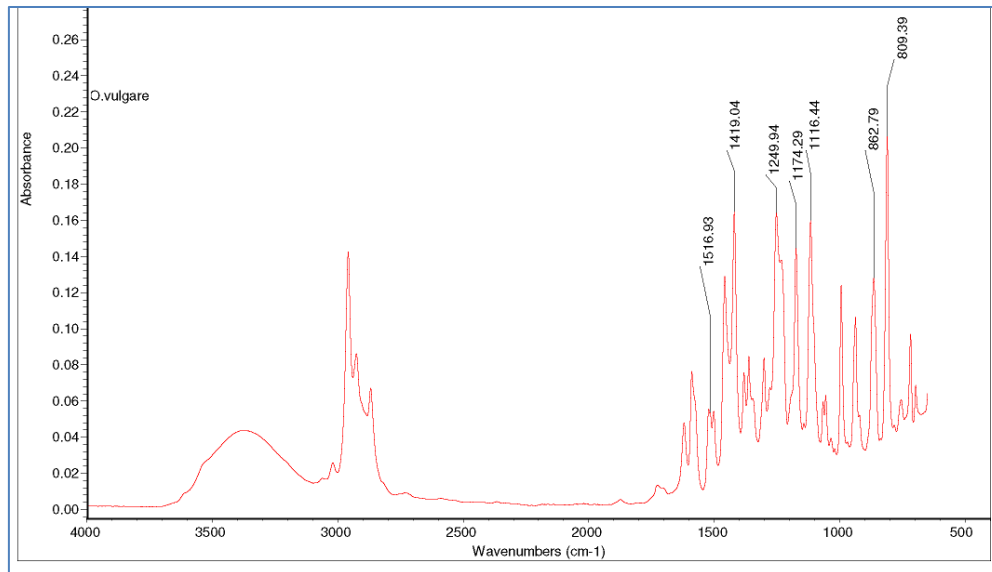
### Određivanje strukture ATR-FTIR spektrofotometrijom

Na *Slici 36.* prikazan je ATR-FTIR spektar EUO. Osnovne komponente EUO su karvakrol i timol, a još mogu, u značajnijem procentu, biti prisutni i p-cimen i  $\gamma$ -terpinen (Schulz *i sar.*, 2005). Spektri ovih terpenoida pokazuju karakteristične pikove koji su indikatori određenih veza. U *Tabeli 12.* su prikazani karakteristični pikovi za terpenoide EUO. Karakteristični pikovi se javljaju u spektralnom opsegu (800-2000) cm<sup>-1</sup>. U spektru EUO, pik na 809.39 cm<sup>-1</sup> je najverovatnije interferirani pik nastao preklapanjem pikova koji karakterišu vibracione trake aromatičnog prstena poreklom iz timola (804 cm<sup>-1</sup>) i karvakola (811 cm<sup>-1</sup>). Intenzivne trake uočene na 862.79 cm<sup>-1</sup>, 1116.44 cm<sup>-1</sup>, 1174.29 cm<sup>-1</sup>, 1249.94 cm<sup>-1</sup>, 1419.04 cm<sup>-1</sup>, u kombinaciji sa pikom na 809.39 cm<sup>-1</sup> nedvosmisleno ukazuju na osnovnu komponentu u sastavu EUO, a to je karvakrol. Pik na 1516.93cm<sup>-1</sup> može ukazivati na p-cimen, dok karakteristični pikovi  $\gamma$ -terpinena nisu identifikovani, najverovatnije zbog malog udela ove komponente u sastavu EUO.

**Tabela 12. Talasne dužine na kojima se javljaju intenzivni karakteristični pikovi terpenoida EUO (Schulz *i sar.*, 2005)**

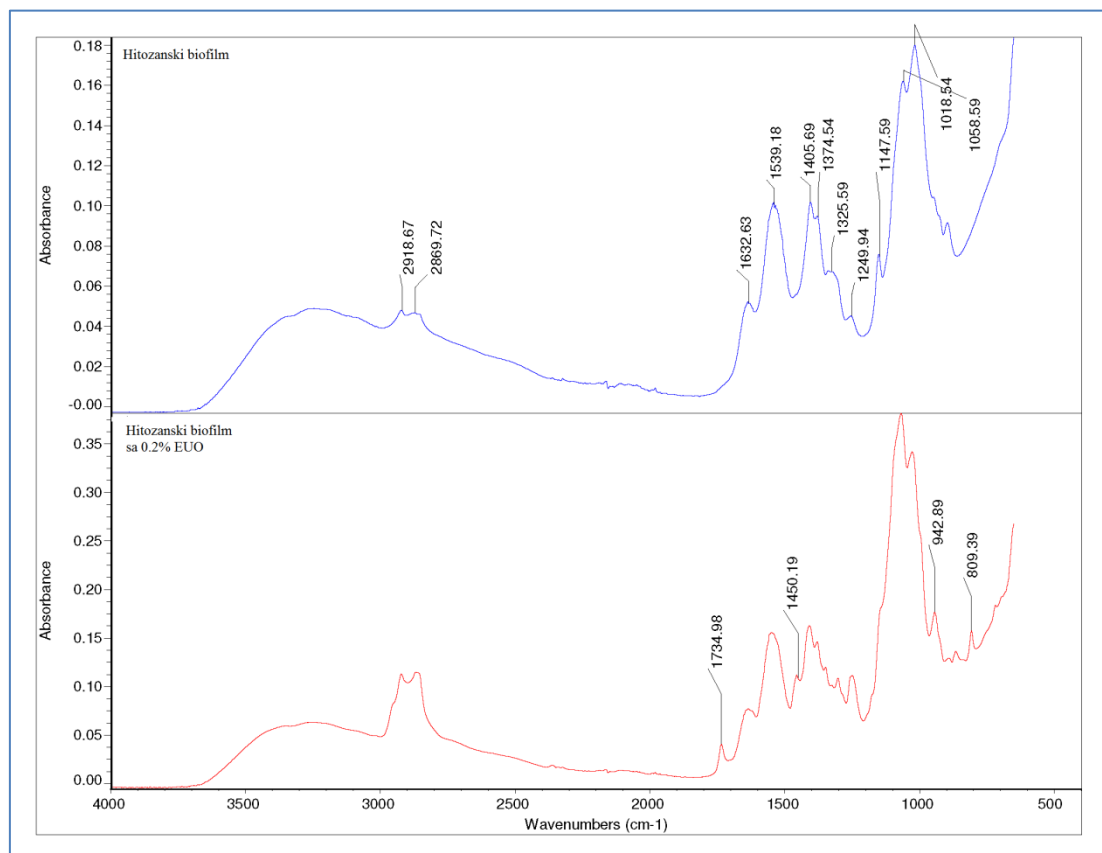
Komponente	ATR-IR (cm <sup>-1</sup> )	Grupa
Karvakrol	811	w (C-H)
Timol	804	w (C-H)
p-Cimen	1515	w (C-H)
	813	w (C-H)
$\gamma$ Terpinen	947	w (CH <sub>2</sub> )
	781	w (CH <sub>2</sub> )

w-vibracija mahanja, klaćenja (wagging)



Slika 36. ATR-FTIR spektar etarskog ulja origana

Na Slici 37. su prikazani ATR-FTIR spektri odabranog hitozanskog biofilma sa 0.2% EUO. Većina karakterističnih pikova, tipičnih za hitozanski biofilm formiran iz rastvora hitozana u sirćetnoj kiselini je identifikovan u spektru hitozanskog biofilma. Karakteristični spektri su dati u Tabeli 13. (Liu *i sar.*, 2013).



Slika 37. ATR-FTIR spektar hitozanskog biofilma i hitozanskog biofilma sa 0.2% etarskog ulja origana

Široka apsorpciona traka koja se proteže od oko 3500  $\text{cm}^{-1}$  do oko 3000  $\text{cm}^{-1}$  obuhvata pikove  $-\text{NH}$  i  $-\text{OH}\cdots\text{O}$  vibracije istezanja, kao i intermolekularne vodonične veze između molekula hitozana. Amino grupa ima karakterističan pik na (3400-3500)  $\text{cm}^{-1}$ , ali je on maskiran širokom apsorpcionom trakom hidroksilne grupe. Apсорpcione trake na 2918.67  $\text{cm}^{-1}$  i 2869.72  $\text{cm}^{-1}$  predstavljaju vibracioni mod simetričnog i antisimetričnog istezanja u  $-\text{CH}_2$  grupi. Traka na 1632.63  $\text{cm}^{-1}$  najverovatnije potiče amid I grupe (C=O vibracija istezanja), na 1539.1  $\text{cm}^{-1}$  od amid II grupe (N-H vibracija savijanja), a na 1325.59  $\text{cm}^{-1}$  od amid III grupe (C-N). Slab pik na 1147.59  $\text{cm}^{-1}$  je dodeljen C-O-C vibraciji simetričnog istezanja, a pikovi na 1058.59  $\text{cm}^{-1}$  i 1018.54  $\text{cm}^{-1}$  C-O vibraciji istezanja u C-OH grupama na trećem i šestom C atomu (Sionkowska *i sar.*, 2004, Liu *i sar.*, 2013, Leceta *i sar.*, 2013; Zivanovic *i sar.*, 2007; Souza *i sar.*, 2011; Dilamian *i sar.*, 2013). Aktivna grupa hitozonijum acetata ( $-\text{NH}_3^+\text{OOCH}$ ) je okarakterisana dvema apсорpcionim trakama na 1539.1  $\text{cm}^{-1}$  i 1405.69  $\text{cm}^{-1}$  (Lagaron *i sar.*, 2007).

Sa dodatkom EUO u film došlo je do promena u spektru hitozanskog filma, o čemu svedoči i koeficijent korelacije ova dva spektra od 0.7498 (u regionu spektara od 650  $\text{cm}^{-1}$  do 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Ukoliko se posmatra samo deo spektra u kojem se nalaze karakteristične grupe EUO (700  $\text{cm}^{-1}$  do 2000  $\text{cm}^{-1}$ ), ovde je koeficijent korelacije približan ukupnom koeficijentu za čitave spektre i iznosi 0.7377. Ako se uporedi ovaj deo spektra za film sa i bez EUO sa *Slike 37.*, kod filma sa EUO se uočava pojava novih pikova, i to na 1734.98  $\text{cm}^{-1}$ , koji najverovatnije potiče od karbonilne grupe sirćetne kiseline (Ritthidej *i sar.*, 2002), 1450.19  $\text{cm}^{-1}$ , potiče od  $\text{CH}_2$  makazičaste vibracije (Altiok *i sar.*, 2010; Dhanikula i Panchagnula 2004), 942.89  $\text{cm}^{-1}$  (kao da je naznaka ovog pika postojala i kod filma bez EUO, ali je ovde pik jasno diferenciran) i 809.39  $\text{cm}^{-1}$ , najverovatnije interferirani pik nastao preklapanjem pikova koji karakterišu vibracione trake aromatičnog prstena timola i karvakola. Jedan broj pikova hitozanskog biofilma u ovom regionu pretrpeo je izmene, koje se mogu uočiti za pik na 1325.59  $\text{cm}^{-1}$ , gde su se umesto jednog jasnog pika javila dva manja, 1249.94  $\text{cm}^{-1}$ , pik nešto izraženijeg intenziteta, 1058.59  $\text{cm}^{-1}$  i 1018.54  $\text{cm}^{-1}$ , takođe pikovi promenjenog intenziteta.

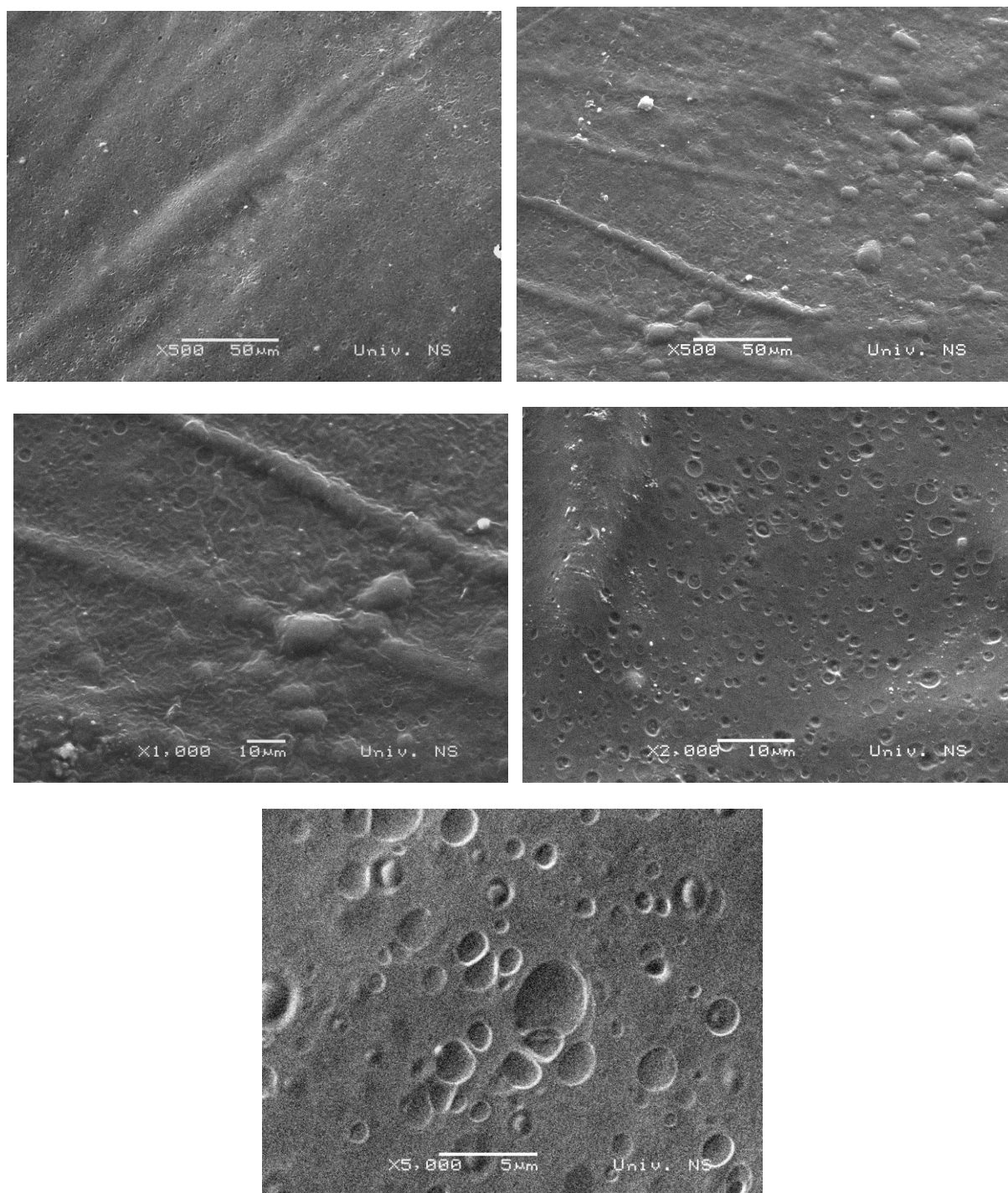
**Tabela 13. Karakteristični pikovi nativnog hitozana u formi pudera (stepen deacetilovanosti 85% i 95%) i hitozanskog biofilma (stepen deacetilovanosti 85% i 95%) (Liu *i sar.*, 2013)**

Karakteristični pikovi ( $\text{cm}^{-1}$ )	Uzorc			
	DD 85%		DD 95%	
	Nativni hitozan	Hitozanski film	Nativni hitozan	Hitozanski film
-OH, $-\text{NH}_2$	3440	3440	3440	3440
$-\text{CH}_2$ simetrično istezanje	2915	2915	2915	2915
$-\text{CH}_2$ asimetrično istezanje	2875	2880	2875	2880
C=O (amid I)	1652	1652	1652	1652
N-H (amid II)	1594	1589	1594	1589
$\text{CH}_2$ savijanje	1421	1417	1421	1417
CH savijanje i $\text{CH}_3$ deformacija	1381	1377	1381	1377
C-N (amid III)	1322	1322	1322	1322
O-H savijanje	1263	1258	1263	1258
C-O-C simetrično istezanje	1154	1150	1154	1150
C-O iz $\text{C}_3\text{-OH}$	1082	1082	1082	1082
C-O iz $\text{C}_6\text{-OH}$	1033	1033	1033	1033

U delu spektra  $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $2000\text{ cm}^{-1}$  uočava se razlika u izgledu pikova na  $2918.67\text{ cm}^{-1}$  i  $2869.72\text{ cm}^{-1}$ , a poređenjem spektara u ovom regionu dobijen je koeficijent korelacije 0.6900, koji govori o značajnim razlikama. Ove izmene karakterističnih pikova znače da je došlo do interakcije između aktivnih grupa EUO i funkcionalnih grupa hitozana (Altiok *i sar.*, 2010; Pranoto *i sar.*, 2005). Na osnovu literaturnih podataka se može zaključiti da od vrste i koncentracije dodatog ulja ili druge aktivne supstance u matriks hitozanskog filma zavisi da li će doći do interakcije između komponenata filma koje će rezultirati promenama u strukturi (vrsti i broju veza). Dodatak ulja timijana, belog luka, ekstrakta semena grožđa nije doveo do promena u strukturi hitozanskog filma, dok su kalijum sorbat, nizin, polifenoli zelenog čaja i ekstrakt zelenog čaja, koji su bili dodati u hitozanski film, doveli do interakcije grupa aktivne supstance i molekula hitozana, što je rezultiralo u promenjenim fizičkim, mehaničkim svojstvima i biološkoj aktivnosti filma (Altiok *i sar.*, 2010; Pranoto *i sar.*, 2005; Wang *i sar.*, 2013; Siripatrawan i Harte 2010; Rubilar *i sar.*, 2013).

### **Određivanje strukture elektron skenirajućom mikroskopijom (SEM)**

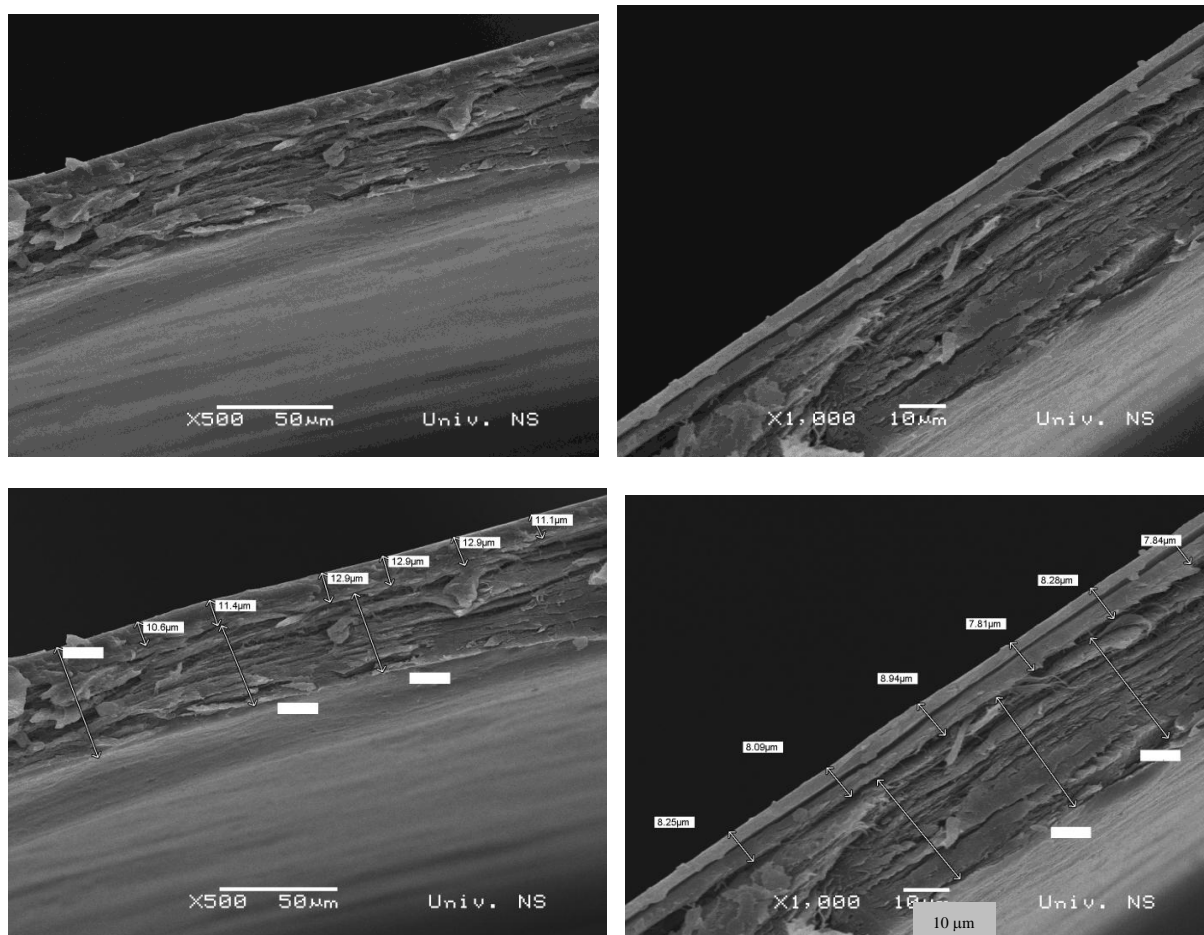
Na *Slikama 38. i 39.* su predstavljeni SEM snimci odabranog laminiranog kolagenog omotača sa 0.2% dodatog EUO. Na *Slici 38.* je predstavljen SEM površine laminiranog kolagenog omotača, dok je na *Slici 39.* predstavljen SEM preseka laminiranog kolagenog omotača. Odabrana su odgovarajuća uvećanja koja na najjasniji način oslikavaju mikrostrukturu ispitivanog omotača. Krajnja struktura, koja se vidi na *Slikama 38. i 39.*, formirana je strukturnim aranžiranjem svih komponenata premaza (hitozan, EUO, Tween 20) u inicijalnoj disperziji i razvojem ovog aranžiranja tokom sušenja i kondicioniranja laminiranog kolagenog omotača (Vargas *i sar.*, 2009). Na *Slici 39.* se može uočiti da hitozanski sloj kontinualno prekriva površinu kolagenske baze. Neravnine kolagenog omotača, u vidu vlakana i nabora, se mogu uočiti i kroz laminirani sloj, posebno na uvećanju  $500\times$  i  $1000\times$ . Na uvećanju  $500\times$  mogu se uočiti okruglasti tragovi koji su najverovatnije posledica mehurova vazduha koji su preko površine izlazili iz unutrašnjosti filma tokom sušenja (Tripathi *i sar.*, 2009; Altiok *i sar.*, 2010). Na uvećanju  $5\ 000\times$  ovi tragovi se jasno vide, a većina ima dijametar ispod  $5\ \mu\text{m}$ . Važno je naglasiti da su ovo samo površinski tragovi, a ne pore u filmu koje bi mogle uticati na svojstva filma. Pri svim prikazanim uvećanjima, uočljivi su nerastvoreni kristali hitozana. Dimenzije ovih kristala su ispod  $5\ \mu\text{m}$ , na osnovu uvećanja  $1000\times$ .



**Slika 38. SEM snimci površine laminiranog kolagenog omotača: predstavljeno je uvećanje 500×, 1000×, 2000× i 5000×**

Na SEM snimcima preseka laminiranog kolagenog omotača, može se uočiti višeslojna struktura. Na snimku koji prikazuje uvećanje 500×, jasno se uočava granica homogenog sloja laminata hitozana (Arzate-Vázquez *i sar.*, 2012; Nunthanid *i sar.*, 2001) i osnove koju čini struktura kolagenog omotača. Hitozanski sloj je ujednačen, homogen, bez pora i pukotina i izgleda kao da potpuno naleže na površinu kolagenog omotača. Daljim uvećanjem se može jasnije uočiti da se i sloj hitozana sastoji iz tri sloja (tri premaza), pri čemu se granica prva dva

jedva uočava i premazi potpuno naležu na površinu kolagena, dok je treći sloj jasno uočljiv i on ne naleže potpuno na prva dva sloja, već se uočavaju delovi gde je on odvojen. Debljina troslojnog hitozanskog premaza kreće se od (7.72 - 12.9)  $\mu\text{m}$ , a prosečna debljina hitozanske prevlake iznosi 9.78  $\mu\text{m}$ . Kao što je zapaženo u radu Martin-Polo *i sar.* (1992), zbog neravnosti površine filma, debljina izmerena mikrometarski je veća od debljine određene pomoću SEM.



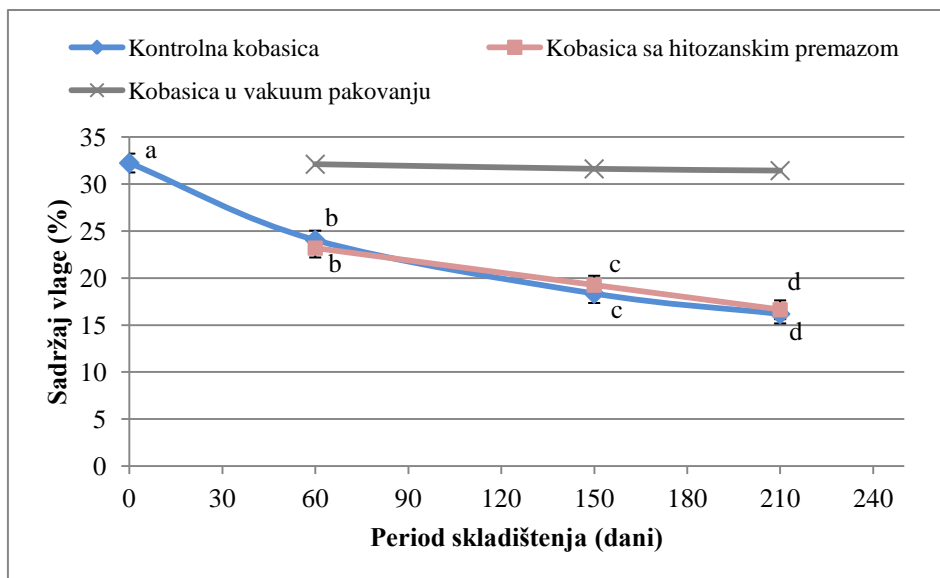
**Slika 39. SEM snimci preseka laminiranog kolagenog omotača: predstavljeno je uvećanje 500 $\times$  i 1000**

#### 4.1.3. Primena hitozanskog premaza sa dodatkom etarskog ulja origana u zaštiti Petrovačke kobasice ("*Petrovská kolbása*")

Na osnovu dobijenih i prodiskutovanih rezultata, za primenu na Petrovačku kobasicu u cilju produženja njene održivosti, odabran je zaštitni premaz sa najmanjom koncentracijom EUO (0.2%). Ovaj zaštitni premaz je odabran zbog optimalnih ispitivanih svojstava, uz obezbeđivanje zaštite senzorskih svojstava kobasice. Poređenjem laminiranog kolagenog omotača sa 0.2% EUO, u odnosu na kolageni omotač bez zaštitnog premaza, došlo je do pozitivnog efekta izuzetno visokog smanjenja propustljivosti za gasove (osim ugljendioksida) i do neželjenog smanjenja zatezne jačine (koja i nakon smanjenja ima zadovoljavajuću vrednost), dok su ostala ispitivana svojstva nepromenjena. U analizi uticaja zaštitnog premaza na bazi hitozana uz dodatak EUO na odabrane parametre kvaliteta Petrovačke kobasice ispitani su: sadržaj vlage, vrednost pH, instrumentalno određivanje boje, masnokiselinski sastav, sadržaj malondialdehida, sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida i senzorski profil mirisa i ukusa. Za pojedina svojstva je, radi poređenja i prikaza poželjnih vrednosti, uz kontrolnu i kobasicu zaštićenu slojem hitozana prikazana i kobasica upakovana u vakuumu (Šojić, 2013; Petrović *i sar.*, 2011).

##### Sadržaj vlage

Gubitak vlage (kalo) je važno fizičko svojstvo koje direktno utiče na većinu senzorskih svojstava, kao i efikasnost i isplativost postupka proizvodnje proizvoda od mesa. Sadržaj vlage je jedan od propisanih parametara kvaliteta za fermentisane suve kobasice. Prema Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa ("Sl. glasnik RS", br. 31/2012 i 43/2013, Član 47.), ovaj tip proizvoda mora da zadovolji zahtev da maksimalni sadržaj vlage u proizvodu ne sme biti veći od 35%. Iz rezultata prikazanih na *Grafiku 8.* može se zaključiti da ispitivani proizvod zadovoljava zahtev regulative. Nakon što se postigne sadržaj vlage 35% ili niži, dalji gubitak vlage je nepoželjan, jer utiče na senzorska svojstva kobasice koja deluje presušeno, tvrdo i naborano. Tokom skladištenja, sadržaj vlage je opadao podjednako u kontrolnoj i u kobasici sa zaštitnim slojem hitozana. Sadržaj vlage, određen nakon 60 dana skladištenja, je iznosio ( $24.05 \pm 0.11$ )% za kontrolnu i ( $23.20 \pm 0.13$ )% za kobasicu sa hitozanskim premazom, a nakon 150 dana skladištenja, ( $18.36 \pm 0.06$ )% za kontrolnu i ( $19.26 \pm 0.05$ )% za kobasicu sa hitozanskim premazom i, nakon 210 dana skladištenja, oko 16% za obe kobasice. U pojedinim kontrolnim tačkama, tokom skladištenja, nije uočena statistički značajna razlika u sadržaju vlage ove dve kobasice ( $p > 0.05$ ). Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima prikazanim za propustljivost vodene pare ispitivanih laminiranih kolagenih omotača, gde između kolagenog omotača i laminiranog kolagenog omotača sa slojem hitozana i 0.2% EUO nema razlike u propustljivosti vodene pare ( $p > 0.05$ , *Grafik 6, B*). Na *Grafiku 8.* je dat prikaz kobasice pakovane u uslovima vakuuma u barijerni ambalažni material, radi oslikavanja mogućnosti usporavanja gubitka vlage.



**Grafik 8. Sadržaj vlage (%) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )**

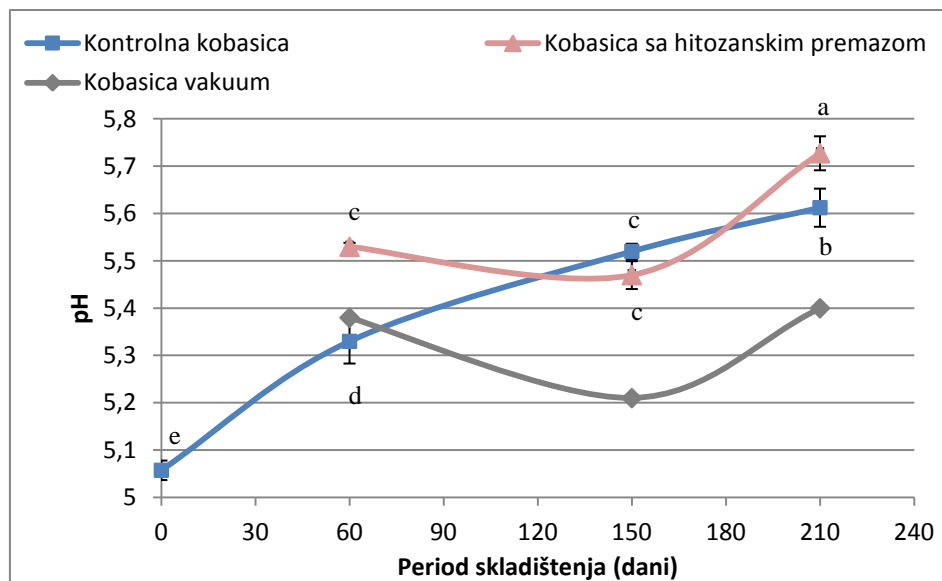
Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa jednim brojem literaturnih podataka. Pokazano je da je, tokom skladištenja, došlo do podjednagog smanjenja sadržaja vlage polutvrđog sira koji je zaštićen slojem hitozana, kao i u kontrolnim uzorcima bez hitozanskog premaza (Fajardo *i sar.*, 2010). Takođe, između grilovanog svinjskog mesa, sa i bez hitozanskog premaza, koje je zatim upakovano pod vakuumom, nisu uočene razlike u teksturi, koja je tesno povezana sa sadržajem vlage u uzorcima. Ovi rezultati su povezani sa lošim barijernim svojstvima hitozanskog filma za vlagu (Yingyuad *i sar.*, 2006). Sa druge strane, zaštitni sloj od visokoviskoznog i srednjeviskozog hitozana, u koncentracijama 0.5% (w/v) i 1% (w/v) doveo je do usporavanja kala fileta haringe i bakalara, sardine i svežeg svinjskog mesa (Jeon *i sar.*, 2002; Mohan *i sar.*, 2012; Xiufang i Boahua 2008). U radu Chamanara *i sar.* (2012), tvrdoća i elastičnost komada kalifornijske pastrmke je bila niža za uzorke uronjene u rastvor hitozana, dok je sposobnost vezivanja vode komada sa slojem hitozana bila značajno viša. Ove pojave su objašnjene velikom sposobnošću hitozanskog filma da vezuje vodu i buri. U istom radu je prikazano da uzorci sa dodatim uljem timijana u hitozanski sloj (pa samim tim najverovatnije i smanjenom sposobnošću bubrenja) nisu pokazali razliku teksturalnih svojstava u odnosu na kontrolne uzorke (Chamanara *i sar.*, 2012). Moguće je da ovo objašnjenje Chamanara *i sar.* (2012) može da se proširi i na ostale literaturne podatke koji su pokazali smanjenje kala mesa, ne zbog održanog sadržaja vlage u mesu, već zbog apsorpcije vlage od strane hitozanskog omotača. U radu Sathivel (2005) je prikazan pozitivan uticaj 1% i 2% hitozanskog omotača na očuvanje sadržaja vlage u smrznutim filetima soma. Ovde je uticaj omotača objašnjen kao sposobnost hidrofilnog hitozanskog omotača da usporava gubitak vlage iz proizvoda, dok voda sadržana u samom omotaču ne ispari. Treba istaći da su, u navedenim radovima, proizvodi, nakon uranjanja u hitozanski rastvor, pakovani u polimerne materijale (PVdC, PE, PP). Za razliku od prikazanih literaturnih navoda, uzorci kobasice u okviru istraživanja prikazanih u ovoj disertaciji, su, nakon nanošenja hitozanskog premaza, čuvani u komori sa kontrolisanim uslovima, bez dodatnog pakovanja. Obzirom na dug period



skladištenja kobasice i veliki vremenski razmak između dve kontrolne tačke, eventualni efekat koji je tanki sloj hitozana mogao imati u usporavanju gubitka vlage iz kobasice nije registrovan.

### Vrednost pH

Jedan od kriterijuma kvaliteta Petrovačke kobasice, istaknut u Tehnološkom elaboratu (Petrović *i sar.*, 2007), je i vrednost pH  $>5.4$ . Vrednost pH kontrolne kobasice na kraju sušenja je u ovom eksperimentu bila niža od preporučene vrednosti. Ova pojava se može objasniti delovanjem mikroflora. Janković (2013) je prilikom izučavanja mikrobiološke populacije i promene inicijalne mikroflora Petrovačkih kobasica zaključila da je slaba acidifikacija nadeva, tj. izostanak obimnije fermentacije u nadevu pogodovao rastu mikrokoka. Nasuprot tome, smanjen razvoj mikrokoka u ispitivanoj kobasici je stvorio povoljne uslove za razmnožavanje laktobacila i nižu vrednost pH. Promene vrednosti pH ispitivanih kobasica, tokom skladištenja, prikazane su na *Grafiku 9.*, gde se vidi da tokom skladištenja dolazi do porasta vrednosti pH ( $p < 0.05$ ) u obe kobasice, ali se trend porasta razlikuje. Kod kontrolne kobasice je došlo do postepenog porasta vrednosti pH, od početnih  $5.05 \pm 0.02$ , na kraju sušenja,  $5.33 \pm 0.05$ , nakon 60 dana,  $5.52 \pm 0.01$ , nakon 150 dana, do vrednosti na kraju skladištenja od  $5.61 \pm 0.04$ . Kod kobasice sa slojem hitozana je došlo do skoka vrednosti pH nakon 60 dana skladištenja ( $p < 0.05$ ) na  $5.53 \pm 0.01$ , nakon čega je došlo do stagniranja vrednosti pH do 150. dana skladištenja ( $p > 0.05$ ), a zatim je vrednost pH nastavila da raste do kraja skladištenja ( $p < 0.05$ ) do  $5.73 \pm 0.04$ . Razlike u vrednostima pH između kontrolne kobasice i kobasice sa hitozanskim premazom su zapažene nakon 60 i nakon 210 dana skladištenja ( $p < 0.05$ ). Promena vrednosti pH u kobasici sa hitozanskim premazom je nešto brža i izraženija u odnosu na kontrolnu kobasicu. Praćenjem promene pH u trinaest modela Petrovačke kobasice tokom tri proizvodne sezone, zapaženo je da vrednost pH u svim kobasicama raste tokom skladištenja (Škaljac, 2014). Sličan trend promene pH tokom skladištenja je zapažen kod fermentisane suve kobasice Poličan, a ovakav trend je objašnjen kao posledica razgradnje mlečne kiseline, do koje dolazi nakon što se potroše šećeri i/ili izraženoj proteolitičkoj aktivnosti prisutne mikroflora (*Staphylococcus spp.*) uz formiranje peptida, amino kiselina i amonijaka, što je ovde najverovatnije slučaj (Saláková *i sar.*, 2010; Kamenik *i sar.*, 2012; Komprda *i sar.*, 2001; Bover-Cid *i sar.*, 1999).



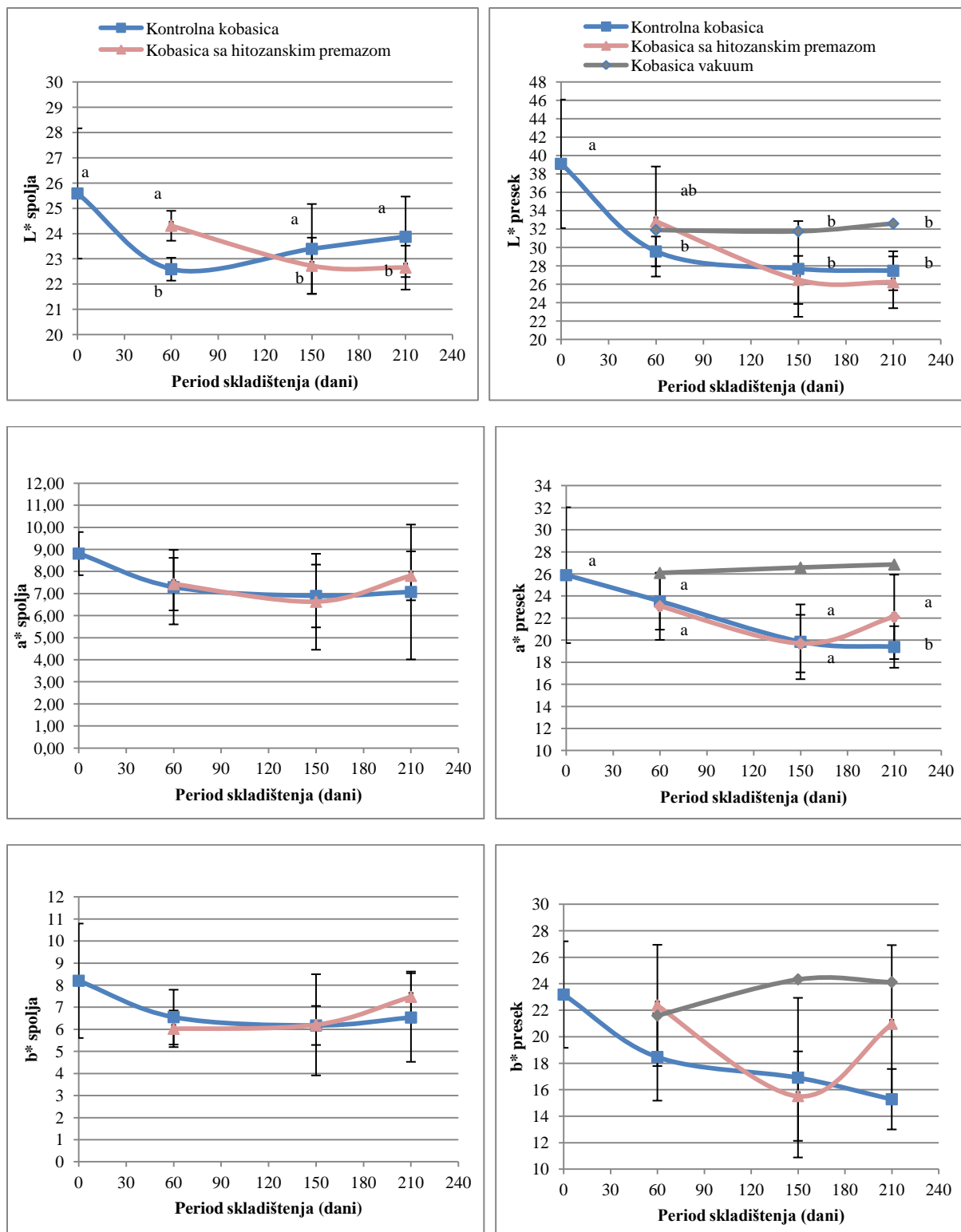
**Grafik 9.** Vrednost pH u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

### Instrumentalno određivanje boje

Boja ima veoma važnu ulogu u izgledu, prezentaciji i prihvatljivosti proizvoda od mesa. Kao kriterijum kvaliteta Petrovačke kobasice u Tehnološkom elaboratu (Petrović *i sar.*, 2007) date su i granice vrednosti svetloće boje preseka,  $L^* = 32-37$ . Međutim, Škaljac (2014), na osnovu utvrđenih rezultata za vrednost svetloće boje ( $L^*$ ) u svojim istraživanjima i uzimajući u obzir rezultate dobijene u toku zaštite ovog proizvoda (Petrović *i sar.*, 2007; Ikonić *i sar.*, 2010; Petrović *i sar.*, 2011), daje predlog da kriterijum za vrednost svetloće boje ( $L^*$ ) bude samo ograničen na maksimalnu vrednost, tj. da svetloća boje ( $L^*$ ) ne sme biti veća od 37 ( $L^* \leq 37$ ), jer vrednosti niže od 32 mogu biti posledica manjeg sadržaja masti ili dužeg procesa sušenja i zrenja, što može rezultirati boljim senzorskim kvalitetom i poželjnijim senzorskim karakteristikama sa aspekta prihvatljivosti od strane potrošača, ako je zadovoljen kriterijum  $\text{pH} > 5.4$ . Suprotno tome, u slučaju analizirane kobasice, kombinacija uticaja mikroflora, intenzivne acidifikacije nadeva, nešto više temperature tokom sušenja i zrenja, višeg sadržaja ukupnih masti i intenzivne oksidacije pigmenta pod dejstvom endogenih lipaza doveli su do razvijanja nepoželjne boje preseka kobasice, visoke vrednosti za  $L^*$  i  $b^*$ .

Na *Grafiku 10.* su prikazani parametri boje  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  površine i preseka Petrovačke kobasice na kraju sušenja i tokom skladištenja od 7 meseci. Kada je u pitanju boja površine, samo parametar  $L^*$  se menjao tokom vremena, i to postupno se smanjujući za kobasice sa slojem hitozana ( $p < 0.05$ ) do 5 meseci skladištenja, nakon čega nije uočena dalja promena svetloće, dok je kod kontrolne kobasice došlo do inicijalnog pada vrednosti svetloće, nakon čega je  $L^*$  postepeno raslo. Parametri boje  $a^*$  i  $b^*$  spoljne površine nisu se menjali ni kod jedne grupe kobasica tokom skladištenja ( $p > 0.05$ ). Poređenjem vrednosti parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , tokom skladištenja, za kontrolnu kobasicu i kobasicu sa hitozanskim premazom, samo je za vrednosti  $L^*$  uočena razlika ( $p < 0.05$ ). Nakon 60 dana skladištenja, kobasica sa hitozanskim premazom je imala višu vrednost  $L^*$ , dok je nakon 150 i 210 dana skladištenja, vrednost  $L^*$  u ovoj kobasici bila niža u odnosu na kontrolnu kobasicu. Ovi rezultati su u skladu sa

rezultatima prikazanim za boju laminiranog kolagenog omotača, gde je pokazano da je uticaj laminacije na boju kolagenog omotača minimalan (Tabela 9). Kod preseka kobasice je došlo do manje promene parametara  $L^*$  i  $a^*$  tokom skladištenja, dok je parametar  $b^*$  ostao nepromenjen, kod obe ispitivane grupe kobasica. Vrednost svetloće preseka kontrolne kobasice na kraju sušenja je bila nešto iznad vrednosti koju zahteva Tehnološki elaborat i iznosila je 39.12. Do značajne promene svetloće preseka ( $p < 0.05$ ) je došlo nakon prvih 2 meseca skladištenja kontrolne kobasice, kada je vrednost  $L^*$  pala na 29.59 i nadalje tokom skladištenja se vrednost ovog parametra nije značajno menjala ( $p > 0.05$ ). Senzorska ocena boje i održivosti boje ove kobasice, data kod Škaljac (2014), je bila najviša 60. dana skladištenja, na osnovu čega autor zaključuje da su nešto niže vrednosti parametara boje u odnosu na one utvrđene na kraju skladištenja senzorsko prihvatljivije. Kod preseka kobasice sa zaštitnim slojem hitozana je krajnja vrednost parametra  $L^*$  ista kao kod kontrolne kobasice ( $p > 0.05$ ), ali je opadanje vrednosti svetloće teklo nešto postupnije. Vrednost  $L^*$  je, 60. dana skladištenja, iznosila 32.85, 120. dana 26.50 i 210. dana 26.24. Pérez-Alvarez *i sar.* (1999) su smanjenje vrednosti svetloće boje ( $L^*$ ) na preseku fermentisanih suvih kobasica tokom procesa dimljenja i sušenja doveli u korelaciju sa smanjenjem sadržaja vlage, a povećanje vrednosti svetloće boje ( $L^*$ ) sa smanjenjem vrednosti pH, jer kako se ta vrednost približava izoelektičnoj tački proteina mesa, dolazi do umrežavanja miofibrila i deo vode se istisne van miofibrila, što dovodi do veće refleksije svetlosti i povećanja  $L^*$  vrednosti. Udeo crvene boje  $a^*$  se kod preseka kobasice zaštićene hitozanskim slojem nije menjao tokom skladištenja, dok je kod kontrolne kobasice došlo do smanjenja udela crvene boje ( $p < 0.05$ ) nakon 7 meseci skladištenja, kada je vrednost  $a^*$  pala sa početnih 25.9 na 19.40. Kako karakteristična tamno crvena boja preseka ove kobasice uglavnom potiče od crvene začinske paprike i komponenata dima, to do opadanja vrednosti  $a^*$  dolazi najverovatnije zbog oksidacije komponenata začinske crvene paprike. Zaštitna uloga hitozanskog omotača sa dodatim EUO prema boji Petrovačke kobasice na preseku se ispoljila u vidu odlaganja smanjenja parametra  $L^*$  i očuvanje vrednosti  $a^*$  na početnom nivou. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima rada u kojem je 0.5%-tni hitozanski zaštitni sloj sa dodatim ekstraktima začina zaštitio boju svežeg svinjskog mesa i značajno usporio stvaranje metmioglobina (Xiufang i Boahua, 2008). U literaturi postoji veći broj navoda koji govore u prilog zaštitnom svojstvu hitozanskog premaza u očuvanju boje mesa i proizvoda od mesa tokom skladištenja. Kada je izučavana promena boje grilovanog svinjskog mesa tokom skladištenja, najizraženiji zaštitni efekat prema boji mesa je pokazalo pakovanje pod vakuumom, uz prethodnu zaštitu hitozanskim premazom, zatim pakovanje pod vakuumom, a najintenzivnije promene su uočene kod uzoraka pakovanih sa atmosferskim vazduhom. Ove razlike su objašnjene kao negativni uticaj kiseonika na kvalitet ispitivanog mesa, koji dovodi do oksidacije lipida, pigmentata i mikrobiološkog kvara, što mogu biti uzroci diskoloracije.



**Grafik 10. Parametri boje: L\*, a\*, b\* spoljne površine i preseka u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b označavaju statistički značajno različite vrednosti (p<0.05).**

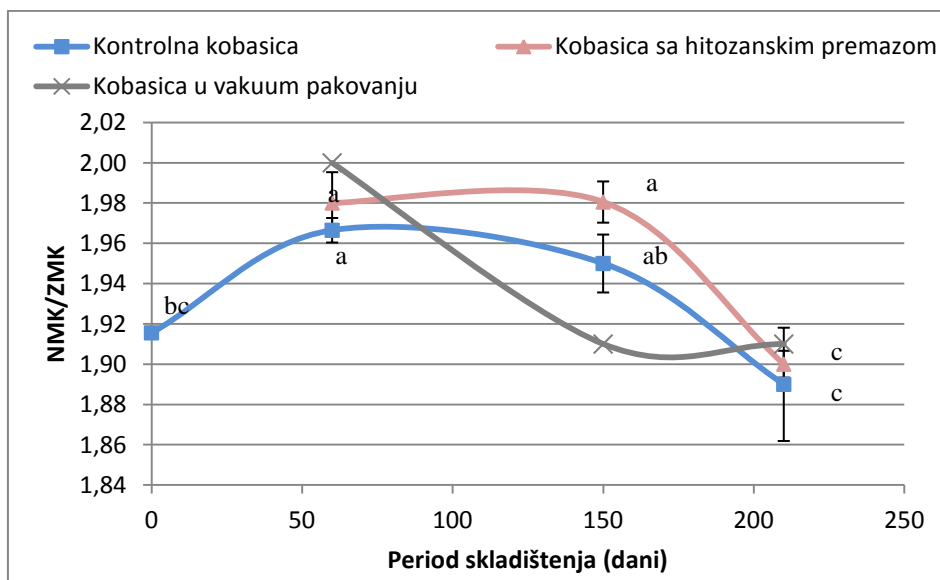
U ambalaži u uslovima vakuuma je koncentracija kiseonika u kontaktu sa proizvodom minimalna, a kod uzoraka koji su zaštićeni slojem hitozana dodatni doprinos daje i formirani hitozanski premaz na površini kobasice, koji ima nisku propustljivost kiseonika (Yingyuad *i sar.*, 2006). Tokom skladištenja kuvane kobasice od svinjskog mesa, došlo je do diskoloracije

koja je registrovana kao porast vrednosti parametara  $L^*$  i  $b^*$ , odnosno kao pojava sivkastog obojenja. U radu je ova promena objašnjena kao posledica lipidne oksidacije i mikrobiološkog kvara, gde je došlo do akumulacije vodonik peroksida kao produkta bakterija mlečnog vrenja. Nastali peroksid reaguje sa nitrozilmioglobinom i nitrozilhemohromogenom dajući zelenkastu boju proizvodu od mesa. Uzorci zaštićeni hitozanskim omotačem, sa i bez ekstrakta zelenog čaja, pokazali su daleko niži intenzitet diskoloracije u datim uslovima (Siripatrawan i Noipha, 2012). Hitozanski zaštitni sloj je usporio pad  $L^*$  vrednosti i kod sardine tokom skladištenja, dok u uslovima ispitivanja nije došlo do značajne promene  $a^*$  i  $b^*$  parametra (Mohan *i sar.*, 2012).

Pored efekta hitozanskog premaza, i EUO može imati uticaja na očuvanje boje mesa i proizvoda od mesa. U eksperimentu, gde je na površinu svežih govedih odrezaka sprej tehnikom nanesen ekstrakt origana, ili su odresci upakovani u aktivni PP film obložen ekstraktom origana, pokazan je pozitivan efekat ekstrakta origana u zaštiti boje svežeg mesa i odlaganja formiranja metmioglobina, pri čemu je efekat direktnog nanošenja ekstrakta origana bio značajno izraženiji (Camo *i sar.*, 2011).

### Masnokiselinski sastav

Jedan od osnovnih pokazatelja nutritivne vrednosti nekog prehrambenog proizvoda predstavlja **odnos polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina**. Prema preporukama Britanskog Instituta za zdravlje, da bi se neka namirnica mogla deklarirati kao proizvod visoke nutritivne vrednosti, taj odnos mora biti veći od 0.45 (Campos *i sar.*, 2013).



**Grafik 11.** Odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Na *Grafiku 11.* prikazan je odnos sadržaja visokovrednih nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u analiziranim kobasicama, kao i u kobasici upakovanoj pod vakuumom (Šojić, 2013; Petrović *i sar.*, 2011). Tokom skladištenja kontrolne kobasice, došlo je do

porasta odnosa NMK/ZMK, 120. dana, a nakon ovog perioda je došlo do trenda opadanja, najverovatnije kako dolazi do degradacije nezasićenih masnih kiselina. Na kraju skladištenja je odnos NMK/ZMK bio isti kao na kraju sušenja ( $p < 0.05$ ). Dobijeni rezultati za odnos NMK/ZMK kontrolne kobasice je u skladu sa podacima iz literature (Valencia *i sar.*, 2006; Valencia *i sar.*, 2007; Rubio *i sar.*, 2008; Šojić, 2013). Između kontrolne i kobasice zaštićene slojem hitozana nema statistički značajne razlike u odnosu NMK/ZMK tokom čitavog perioda skladištenja ( $p > 0.05$ ), ali ipak treba istaći da su srednje vrednosti odnosa NMK/ZMK više kod kobasice sa hitozanom tokom čitavog perioda skladištenja. Ukoliko se ove vrednosti kobasice sa hitozanskim premazom uporede sa vrednostima za kobasicu upakovanu pod vakuumom, može se zapaziti da su za ove dve kobasice vrednosti ispitivanog pokazatelja masnokiselinskog sastava veoma bliske. Čak je do opadanja vrednosti odnosa NMK/ZMK brže došlo kod kobasice upakovane pod vakuumom i 150. dana skladištenja je vrednost odnosa NMK/ZMK viša i kod kontrolne i kod kobasice sa slojem hitozana, u odnosu na kobasicu upakovanu pod vakuumom.

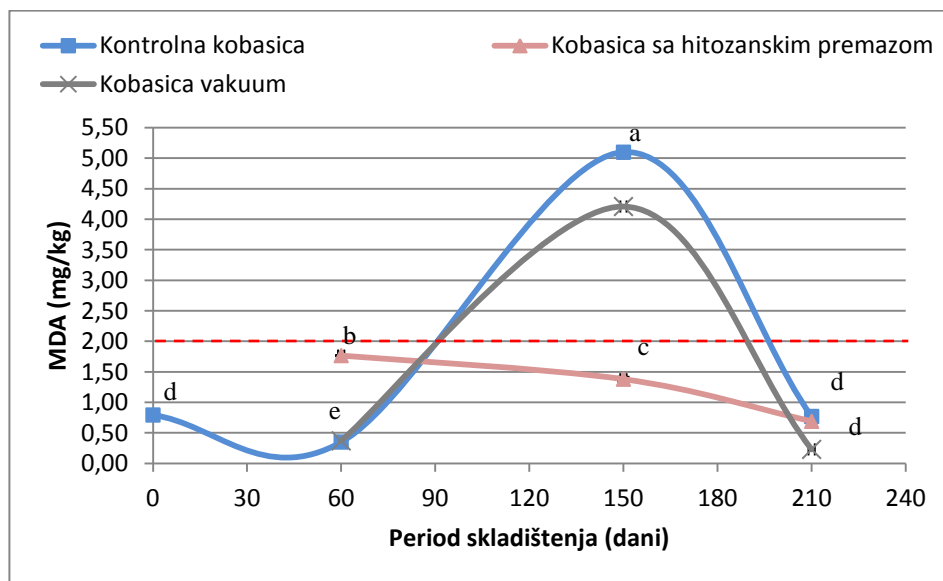
### Sadržaj malondialdehida (TBARS test)

Određivanje sadržaja malondialdehida (MDA test) je jedan od najčešće korišćenih testova za praćenje napredovanja oksidacionog procesa u mesu i proizvodima od mesa. Podaci iz literature ukazuju na granicu detekcije nepoželjnog mirisa na užegnuće odgovara vrednosti MDA od 1.5 mg/kg, prema Martínez *i sar.* (2006), ili čak i nižoj vrednosti od 0.5 -1 mg/kg (Kusmider *i sar.*, 2002; Zanardi *i sar.*, 2004; Mandić, 2007; Šojić, 2013). Za fermentisane suve kobasice ova granica je pomerenjena i do vrednosti od 2 mg/kg (Ansorena i Astiasaran., 2004; Salgado *i sar.*, 2005; Valencia *i sar.*, 2006). Praćenje oksidativnih promena na lipidima kobasice je od suštinske važnosti jer je ovo proizvod koji je mikrobiološki stabilan i kada dođe do kvara to je skoro uvek posledica oksidacije masti.

Na *Grafiku 12.* je prikazan sadržaj MDA u kontrolnoj kobasici, kobasici sa zaštitnim slojem hitozana i, radi poređenja, u kobasici upakovanoj u vakuumu (Šojić, 2013; Petrović *i sar.*, 2011). U momentu pakovanja, sadržaj MDA je bio 0.79 mg/kg, što je na oko polovine intervala vrednosti MDA utvrđenom u momentu pakovanja za 13 modela Petrovačke kobasice, u tri proizvodne sezone, koji se kretao od 0.34 mg/kg do 1.25 mg/kg (Šojić, 2013). Slične rezultate su prikazali i Ansorena i Astiasaran (2004), Valencia *i sar.* (2006), Valencia *i sar.* (2007), Vasilev *i sar.* (2010), Vuković *i sar.* (2011). Nakon 2 meseca skladištenja je došlo do različitog trenda promene sadržaja MDA u kontrolnoj i kobasici sa slojem hitozana. U kontrolnoj kobasici je došlo do pada sadržaja MDA na 0.35 mg/kg, dok je u kobasici sa zaštitnim slojem došlo do porasta ove vrednosti na 1.77 mg/kg. U daljem toku skladištenja dolazi do izrazitog skoka vrednosti sadržaja MDA preko granice užegnuća (označena crvenom linijom na *Grafiku 12*) u kontrolnoj kobasici i vrednost sadržaja MDA, nakon 5 meseci skladištenja, je iznosila 5.10 mg/kg, dok je kod kobasice zaštićene slojem hitozana maksimum sadržaja MDA već postignut 60. dana i nakon toga dolazi do opadanja ove vrednosti. Sadržaj MDA u kobasici sa

hitozanom je 150. dana bio 1.38 mg/kg. Najverovatniji uzrok ovakvog skoka sadržaja MDA preko granice užegnuća u kontrolnoj kobasici je posledica visoke acidifikacije izazvane produkcijom mlečne kiseline i niskim vrednostima pH na početku skladištenja, usled čega dolazi do intenzivnog razmnožavanja heterofermentativnih laktobacila, koji pokazuju prooksidativno dejstvo (Leroy *i sar.*, 2006; Vasilev *i sar.*, 2010; Šojić, 2013). Do kraja skladištenja dolazi do opadanja vrednosti ovog parametra kod obe kobasice i sadržaj MDA se 210. dana ne razlikuje u kontrolnoj i kobasici sa hitozanom. Smanjenje sadržaja MDA tokom skladištenja je najverovatnije posledica interakcije ovog jedinjenja sa razgradnim produktima nastalim u toku procesa zrenja, kao što su aminokiseline, šećeri i nitriti (Janero, 1990; Ansorena i Astiasaran, 2004; Šojić *i sar.*, 2014). Zaštitni sloj hitozana sa EUO je pokazao izraženi efekat u smanjenju intenziteta oksidacije lipida. U Petrovačkoj kobasici, tokom svih 7 meseci skladištenja, kobasica sa hitozanom i EUO je bila u zoni ispod granice užegnuća fermentisane suve kobasice, za razliku, kako od kontrolne, tako i od kobasice upakovane u vakuumu. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji su dati za hitozanski premaz na različitim vrstama riba: tolstolobik, sardina, losos, bakalar i haringa, gde je hitozan inhibirao oksidaciju lipida u mesu riblje (Fan *i sar.*, 2009; Sathivel *i sar.*, 2007; Jeon *i sar.*, 2002). Predloženo je više mehanizama antioksidativnog delovanja hitozana, među kojima je niska propustljivost hitozanskog zaštitnog sloja za kiseonik, formiranje stabilne fluorosfere reakcijom između primarnih amino grupa hitozana i isparljivih aldehida, kao što je MDA (Weist i Karel, 1992), sposobnost heliranja metalnih jona koji se oslobađaju iz hemoproteina mesa tokom skladištenja i hvatanja slobodnih radikala (Park, *i sar.*, 2004; Peng, 1998). Minimiziranje oksidacije lipida tokom skladištenja grilovane svinjetine koja je zaštićena hitozanskim premazom, pa upakovana u vakuumu je objašnjeno kao suma efekata vakuuma i niske propustljivosti hitozanskog premaza za kiseonik (Yingyuad *i sar.*, 2006). Dodavanje ekstrakata ili etarskih ulja biljaka u hitozanski omotač pojačava njegovo antioksidativno delovanje i može dodatno da odloži oksidaciju lipida, kao što je prikazano u literaturi. Ovaj zaštitni efekat je prikazan na primeru svinjskog mesa zaštićenog hitozanskim premazom i ekstraktima začina (cimet, ruzmarin, karanfilić) skladištenog na  $-4^{\circ}\text{C}$ , tokom 28 dana; na primeru ribe (kalifornijska pastrmka) zaštićene hitozanskim premazom sa uljem cimeta; ribe zaštićene hitozanskim premazom i etarskog ulja ruzmarina ili polifenolima zelenog čaja; na primeru kuvane kobasice od svinjskog mesa zaštićene hitozanskim premazom sa ekstraktom zelenog čaja, kao i na primeru pilećeg mesa zaštićenog hitozanskim premazom sa EUO i poluproizvoda na bazi pilećeg mesa zaštićenog hitozanskim premazom sa etarskim uljem timijana (Xiufang i Boahua 2008; Ojagh *i sar.*, 2010; Li *i sar.*, 2012; Siripatrawan i Noipha 2012; Petrou *i sar.*, 2012; Giatrakou *i sar.*, 2010). Mehanizam antioksidativnog delovanja herbalnih etarskih ulja ili ekstrakata se ispoljava zahvaljujući njihovoj sposobnosti da prekinu lanac reakcija slobodnih radikala donirajući vodonikov atom (Georgantelis *i sar.*, 2007; Petrou *i sar.*, 2012). Antioksidativno delovanje samog EUO je pokazano na primeru svežih govedih odrezaka na koje je, ili direktno nanesen ekstrakt origana, ili su odresci upakovani u aktivni PP film sa inkorporiranim ekstraktom origana, gde je lipidna oksidacija značajno

odložena i umanjena, proporcionalno koncentraciji upotrebljenog ekstrakta origana. Pritom je najefikasnija zaštita postignuta uklanjanjem odredaka ekstrakta origana, što je najverovatnije posledica slabe difuzije ekstrakta iz aktivnog filma u proizvod. Autori su dali dve hipoteze mogućeg delovanja aktivnog filma, da aktivni ekstrakt origana sprečava nastajanje slobodnih radikala difundujući iz filma u proizvod ili da, zbog slabog otpuštanja ekstrakta iz aktivnog PP filma, koji su označili kao neznatno postoji mogućnost da aktivni film deluje na površini proizvoda, hvatajući slobodne radikale iz mesa i vezujući ih za aktivni film (Tovar *i sar.*, 2005; Camo *i sar.*, 2011).



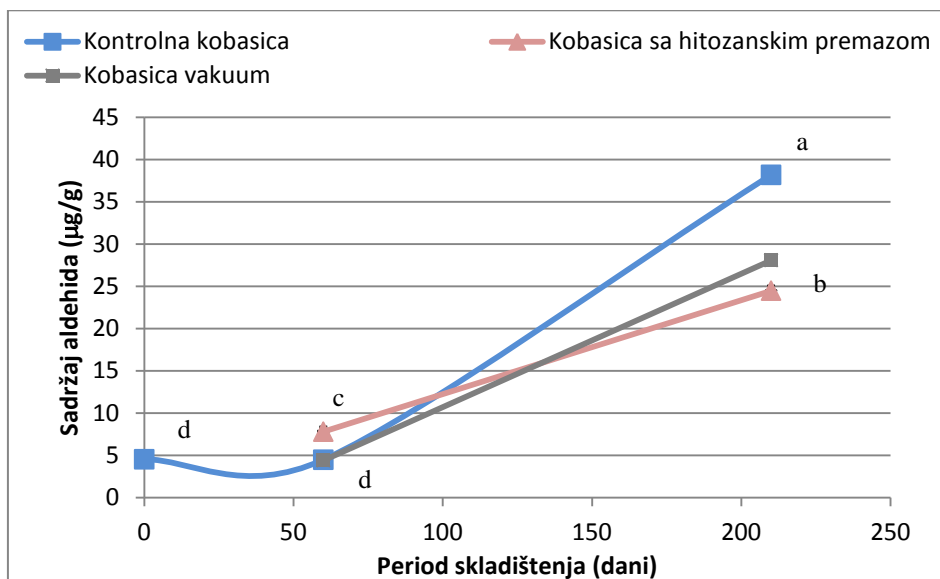
Grafik 12. Sadržaj malondialdehida (mg/kg) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

### Sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida

Određivanje sadržaja MDA je metoda koja je pogodna za poređenje uzoraka istog tipa podvrgnutih različitim uslovima. Kada se prati tok oksidacije tokom dužeg perioda, ovu metodu je poželjno dopuniti dodatnim testom, obzirom da proizvedeni MDA može da reaguje sa drugim konstituentima, kao što su amino kiseline, šećeri i nitriti, što znači da sadržaj MDA može padati i rasti tokom skladištenja (Rubio *i sar.*, 2008). U okviru ove disertacije je, pored sadržaja MDA, tok oksidativnih promena u Petrovačkoj kobasici praćen i preko ukupnog sadržaja zasićenih alifatičnih aldehida (Grafik 13). Sa *Grafika 13.* se vidi da se ukupni sadržaj aldehida tokom skladištenja razlikuje za kontrolnu kobasicu i kobasicu zaštićenu slojem hitozana. Nakon dva meseca skladištenja, kobasica zaštićena hitozanskim omotačem imala je nešto viši sadržaj ukupnih aldehida ( $p < 0.05$ ), ali je na kraju perioda skladištenja od 7 meseci slika potpuno drugačija i kobasica sa hitozanskim slojem ima daleko niži sadržaj ukupnih aldehida ( $p < 0.05$ ), u odnosu na kontrolnu kobasicu. Na kraju perioda skladištenja, kobasica sa hitozanom ima niže vrednosti ukupnog sadržaja aldehida čak i u odnosu na kobasicu upakovanu u vakuumu (Šojić, 2013; Petrović *i sar.*, 2011). Ovaj rezultat je potvrdio rezultat dobijen analizom sadržaja



MDA, da je zaštitni premaz na bazi hitozana sa EUO doveo do značajnog smanjenja intenziteta lipidne oksidacije u Petrovačkoj kobasici.

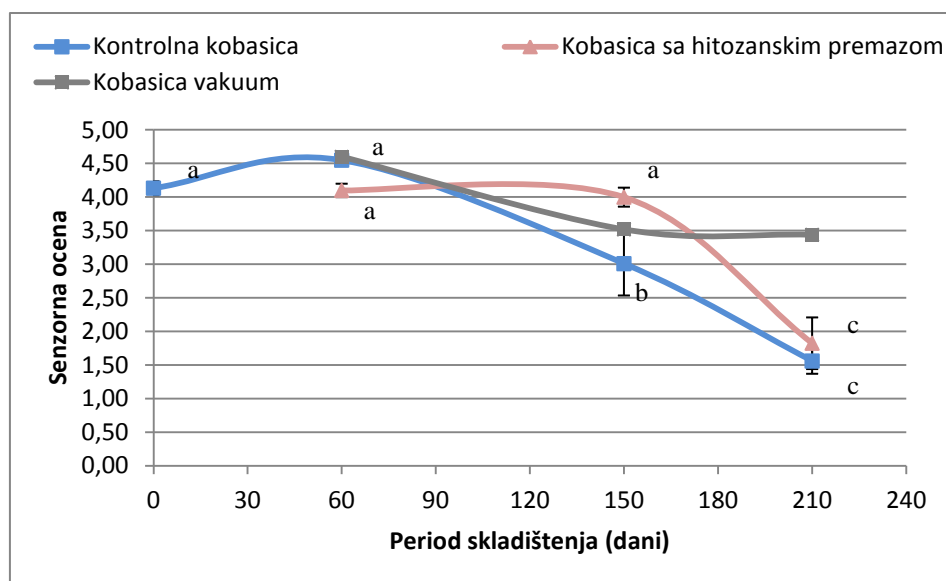


**Grafik 13.** Suma zasićenih alifatičnih aldehida (µg/kg) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Dobijeni rezultati su uporedivi sa rezultatima dobijenim za sadržaj propanala i ukupnih isparljivih jedinjenja fileta i usitnjenih komada ribe som, kao i fileta haringe i bakalara koji su bili zaštićeni slojem hitozana različitih molekulskih masa, pri čemu je zaštitni efekat bio najizraženiji kod hitozana većih molekulskih masa (Hammond, 2004; Yeon *i sar.*, 2002).

### Senzorska analiza profila mirisa i ukusa

Senzorska ocena mirisa i ukusa Petrovačke kobasice prikazana je na *Grafiku 14*. Najviša prosečna ocena mirisa i ukusa je bila 4.55, koja je zabeležena za kontrolnu kobasicu 60. dana, a najniža ocena od 1.56 je zabeležena za kontrolnu kobasicu 210. dana. Promena senzorske ocene kontrolne kobasice tokom skladištenja je zabeležena nakon 5 meseci skladištenja kada su senzorska svojstva ukusa i mirisa ove kobasice ocenjena sa 3.01, značajno nižom ocenom ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kraj sušenja, sa napomenom da se pojavio ukus i miris slabog užegnuća. Zaštitni sloj hitozana i EUO je doprineo da ova kobasica do 150. dana ima očuvana senzorska svojstva. Nešto niža vrednost ocene mirisa i ukusa je dodeljena ovoj kobasici 60. dana, jer je detektovan blag nekarakterističan miris na origano. U daljem toku skladištenja dolazi do pogoršanja senzorskih svojstava obe kobasice i 210. dana senzorske ocene mirisa i ukusa kontrolne kobasice i kobasice sa hitozanom se međusobno ne razlikuju značajno ( $p > 0.05$ ) i imaju vrednost ispod 2. Rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u analizi oksidativnih promena na lipidima kobasice.



**Grafik 14.** Senzorska ocena ukusa i mirisa Petrovačke kobasice tokom skladištenja. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Slično rezultatima prikazanim u ovoj tezi, hitozanski omotač je produžio period senzorske prihvatljivosti Kalifornijske pastrmke sa 8 na 12 dana, a hitozanski omotač sa etarskim uljem cimeta je ovaj period produžio do čak 16 dana. Veoma slični rezultati su dobijeni i za komade ove ribe uronjene u rastvor hitozana ili u rastvor hitozana i etarskog ulja timijana, gde je senzorska prihvatljivost produžena sa 8 na 15 dana (Ojagh *i sar.*, 2010; Chamanara *i sar.*, 2012). Slični rezultati su dobijeni i za uzorke ribe tolstolobik uronjene u rastvor hitozana, gde su, iako je ukupna senzorska ocena opadala tokom perioda skladištenja, uzorci sa hitozanom bili senzorski prihvatljivi tokom 30 dana skladištenja, dok su kontrolni uzorci bili prihvatljivi do 25. dana (Fan *i sar.*, 2009). Fileti ribe zaštićene slojem hitozana i polifenolima zelenog čaja ili etarskog ulja ruzmarina su bili ocenjeni kao senzorski prihvatljivi do 16., odnosno 19. dana, dok je kontrolni uzorak bio senzorski neprihvatljiv 12. dana (Li *i sar.*, 2012). Grilovano svinjsko meso, pakovano u atmosferskim uslovima, je senzorski ocenjeno kao prihvatljivo do 7. dana skladištenja, pakovano pod vakuumom do 14. dana, a zaštićeno slojem hitozana (nezavisno od koncentracije hitozana) u pakovanju pod vakuumom, čak do 28. dana (Yingyuad *i sar.*, 2006). Za razliku od ovog rezultata, održivost fileta sardine, sa stanovišta ukupne senzorske ocene, je produžena sa 5 dana na 8 dana, za hitozanski omotač sa koncentracijom hitozana 1% i 10 dana za hitozanski omotač sa koncentracijom hitozana 2% (Mohan *i sar.*, 2012). Na osnovu ukupne senzorske ocene, kuvana kobasica od svinjskog mesa je bila prihvatljiva do 12. dana skladištenja, kobasica sa zaštitnim slojem hitozana do 20. dana skladištenja, a kobasica sa zaštitnim slojem hitozana i ekstraktom zelenog čaja do 24. dana skladištenja (Siripatrawan i Noipha, 2012). Prisustvo hitozanskog omotača ili hitozanskog omotača sa etarskim uljem nije ni u jednoj navedenoj analizi negativno uticalo na senzorsku ocenu, iako su panelisti primetili prisustvo stranog mirisa i ukusa.

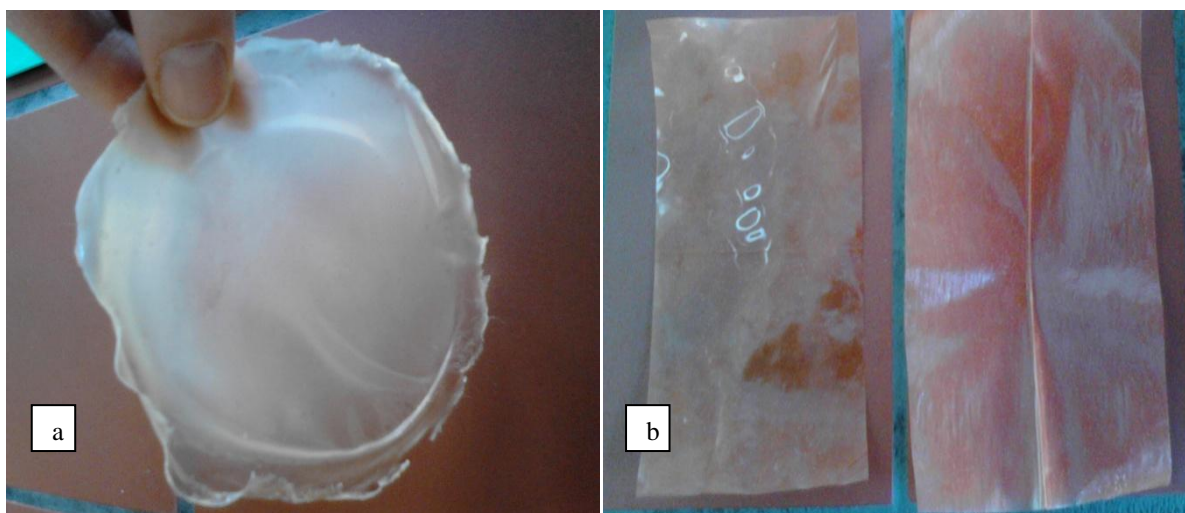
U ovoj tezi je uočena pojava mirisa na origano, ali ona nije negativno uticala na senzorsku ocenu. Sa druge strane, hitozanski premaz sa EUO je imao izražen pozitivan uticaj na očuvanje senzorskih svojstava mirisa i ukusa Petrovačke kobasice tokom skladištenja do 150-og dana skladištenja, čak i u odnosu na kobasicu upakovanu pod vakuumom.

#### **4.2. Karakterizacija i primena hitozanskog biofilma sa dodatkom etarskog ulja kima i odgovarajućeg laminiranog kolagenog omotača**

U cilju dalje optimizacije premaza za zaštitu fermentisanih suvih kobasica, EUO je zamenjeno etarskim uljem kima (EUK), jer je kim začim koji ulazi u sastav Petrovačke kobasice, pa je bilo očekivano da primena veće koncentracije EUK neće negativno uticati na senzorski profil ukusa i mirisa kobasice. Usvojenom metodom pripreme filmova, sintetisan je kompaktan film bez izdvajanja ulja sa maksimalnom koncentracijom EUO u filmu 0.8%. Generalno, ukoliko bi bili ostvareni pozitivni rezultati, oni bi mogli biti primenjeni i na druge proizvode od mesa istog tipa, uz zamenu EUK etarskim uljem crnog bibera, belog luka, cimeta, ili kombinacijom začina koji su deo recepture u proizvodnji kobasice. Na ovaj način bi se mogla koristiti pozitivna svojstva etarskog ulja, uz očuvanje autentičnog senzorskog profila fermentisane suve kobasice. Etarsko ulje bi, kao aktivni sastojak, moglo da dodatno doprinese senzorskom profilu arome, uz antioksidativno delovanje i plastifikaciju zaštitnog premaza. U okviru ovog rada je sintetisan i okarakterisan biofilm sa 0.8% EUK, kao i odgovarajući laminirani kolageni omotač, a zatim je formirani hitozanski premaz sa EUK primenjen u cilju produženja održivosti fermentisane suve Petrovačke kobasice.

#### 4.2.1. Karakterizacija hitozanskog biofilma sa dodatkom etarskog ulja kima i odgovarajućeg laminiranog kolagenog omotača

Na *Slici 40.* je prikazan izgled biofilma na bazi hitozana, 0.4% (w/v) i EUK, 0.8% (v/v), kao i odgovarajućeg laminiranog kolagenog omotača. Radi poređenja, prikazan je i kolageni omotač bez nanesenog sloja laminata. Biofilm sa EUK je beličasto-žućkast, mutan, slabo proziran, mek, sa mirisom na kim. U odnosu na film sa istim sadržajem EUO, film je kompaktniji, nema tragova ulja na površini. Obzirom da je primenjen isti postupak pripreme filmova, dobijeni su kompaktniji filmovi, koji se lakše razlivaju na podlozi i manje skupljaju tokom sušenja. Najverovatnije su navedene razlike posledica prirode ulja koje je kompatibilnije i lakše se umešava u filmogenu emulziju. Ukoliko se posmatra laminiran kolageni omotač, uočava se da je, u odnosu na nelaminirani omotač, boja omotača nešto tamnija, materijal je ravan, gladak, mek, sa blagim, prijatnim mirisom na kim, uočava se neravnomerna „prošaranost“ sjajnim i mat površinama, verovatno kao posledica promena u filmogenoj emulziji tokom sušenja. Takođe se uočavaju beli kružni tragovi, najverovatnije na mestima gde se filmogena emulzija nakupljala i zadržavala u naborima kolagenog omotača tokom premazivanja. Ove bele elipsaste šare bi se mogle smatrati nedostatkom premaza u primeni jer mogu podsećati na plesnivost ili neki drugi nedostatak kobasice. Optimizacijom procesa nanošenja premaza (uranjanje, sprej, više tanjih slojeva i sl.) bi se možda moglo uticati na uklanjanje ovog nedostatka. Kada su u pitanju sjajni/mat segmenti, optimizacijom postupka emulgacije (viša temperatura, intenzivnije mešanje, veći dodatak emulgatora ili smeše emulgatora) bi se najverovatnije moglo uticati i na ovaj nedostatak u izgledu premaza, za koji je najpoželjnije da bude ujednačen, sjajan i bez belih tragova.

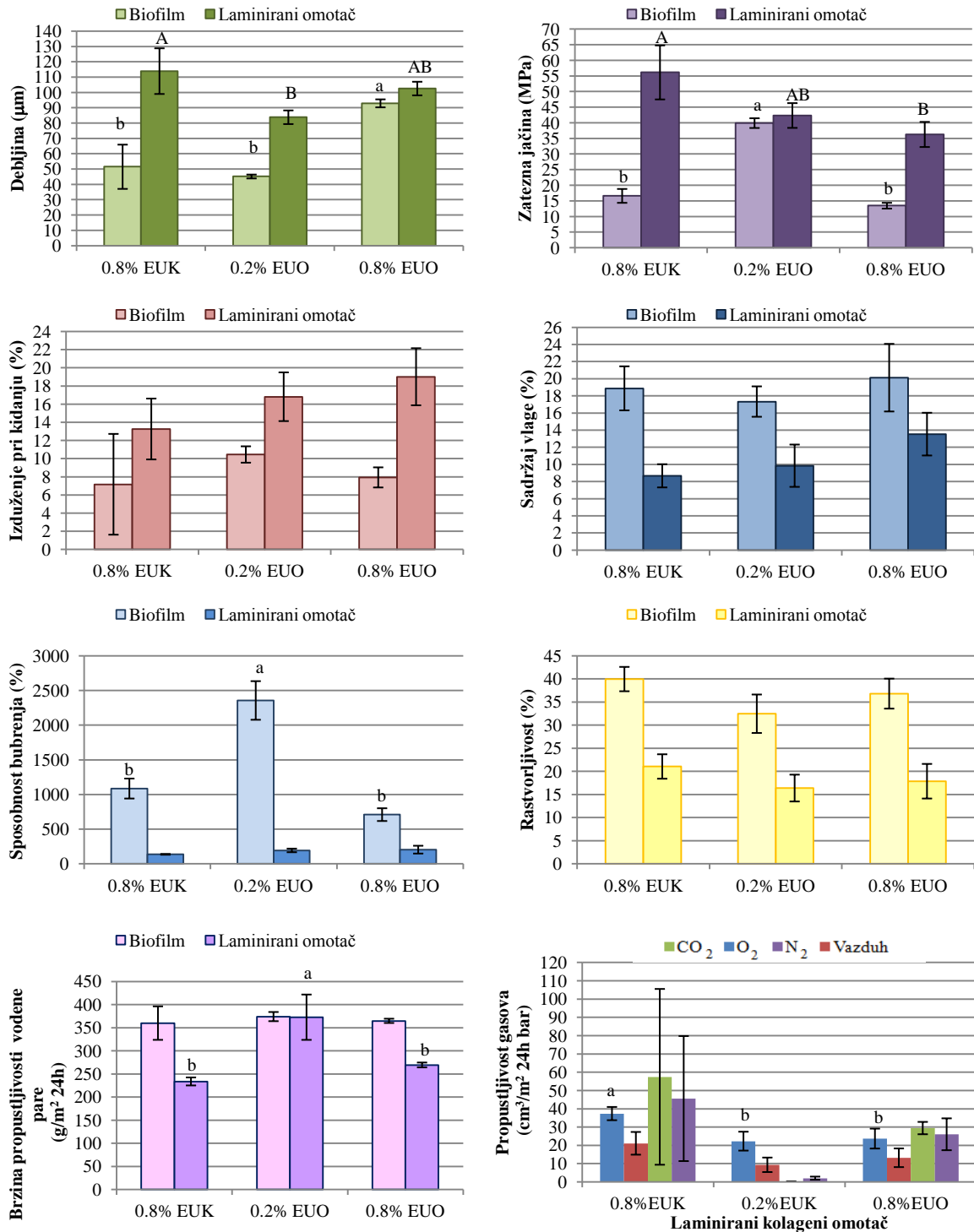


Slika 40. a) Hitozanski biofilm sa dodatkom 0.8% EUK; b) Laminiran i nelaminiran kolageni omotač

## Mehanička, fizičko hemijska i barijerna svojstva biofilma i laminiranog omotača

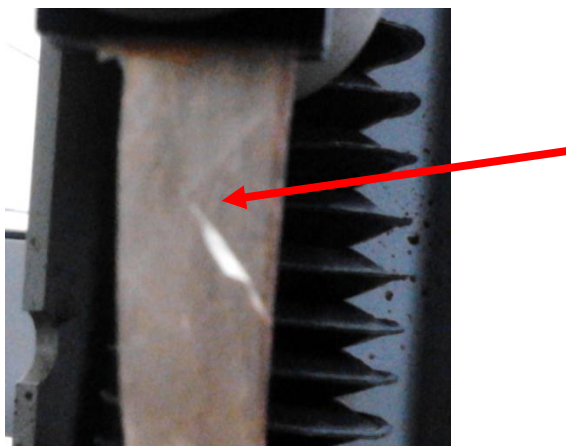
Na *Grafiku 15.* su prikazana mehanička (debljina, zatezna jačina i izduženje pri kidanju), fizičko hemijska (sadržaj vlage, sposobnost bubrenja i rastvorljivost) i barijerna svojstva (brzina propustljivosti vodene pare i propustljivost gasova) za biofilm i laminirani kolageni omotač za filmogenu emulziju sastava 0.4% (w/v) hitozana i 0.8% (v/v) EUK. Radi poređenja, data su ista svojstva i za film i kolageni omotač sa istim sadržajem EUO, kao i za film i omotač koji su korišćeni u prvom eksperimentu sa 0.2% EUO. Obzirom da je u ispitivanju za laminiranje korišćen kolageni omotači različite serije u odnosu na kolageni omotač korišćen u prethodnom eksperimentu, razlike u svojstvima laminiranih omotača mogu poticati, kako od interakcije sa slojem za laminiranje, tako i od razlika u svojstvima kolagenog omotača. Razmatranjem mehaničkih svojstava, može se konstatovati da kod biofilmova postoje razlike u vrednostima za debljinu i zateznu jačinu ( $p < 0.05$ ). U odnosu na biofilm sa EUO, može se primetiti da je debljina biofilma sa EUK manja, za isti sadržaj ulja u filmu. Debljina biofilma sa EUK odgovara vrednosti za debljinu filma sa 4 puta manjim sadržajem EUO. Ovaj rezultat ukazuje na drugačiju prirodu etarskih ulja. Etarsko ulje kima (EUK) je kompatibilnije sa hitozanskim molekulom, te se pri istim uslovima formiranja filma može proizvesti film značajno manje debljine, bolja je organizacija i veća uvezanost komponenata filma. Razlika u debljini laminiranih kolagenih omotača sa 0.8% EUK i 0.8% EUO može poticati od različitih debljina kolagenog omotača.

Zatezna svojstva su u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u prvom eksperimentu sa hitozanskim biofilmom sa EUO i laminiranim kolagenim omotačem sa EUO. Izduženje pri kidanju je isto za sve ispitivane biofilme ( $p > 0.05$ ), dok zatezna jačina zavisi od sadržaja dodatog ulja i sa dodatkom veće količine ulja, zatezna jačina opada. Ovo svojstvo, kako je prikazano ne zavisi od prirode ulja ( $p > 0.05$ ), već samo od njegovog sadržaja u filmu. Kao ni sa dodatkom EUO, tako ni kod EUK, sa dodatkom ulja u biofilm nije zapažen pravi efekat plastifikacije koji bi doveo do smanjenja krtosti hitozanskog biofilma, već dolazi do slabljenja mehaničke jačine filma, dok izduženje ostaje nepromenjeno. Razlika uočena za laminirane omotače sa EUK i EUO, slično kao i kod debljina laminiranih omotača, može poticati i od razlika u kolagenim omotačima.



**Grafik 15.** Mehanička (debljina (mm), zatezna jačina (MPa) i izduženje pri kidanju (%)), fizičko-hemijska (sadržaj vlage (%), sposobnost bubrenja (%) i rastvorljivost (%)) i barijerna (brzina propustljivosti vodene pare ( $\text{g}/\text{m}^2$  24h) i propustljivost gasova ( $\text{cm}^3/\text{m}^2$  24h bar) svojstva hitozanskih biofilmova sa različitim sadržajem EUK i EUO i odgovarajućih laminiranih omotača. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d, e, f, g označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

Pri analizi zateznih svojstava laminiranih omotača, zapažena je pojava razdvajanja slojeva, kada vrednost za izduženje pri kidanju postane bliska vrednosti izduženja pri kidanju za biofilmove. Nakon razdvajanja, sloj laminata puca, dok osnova kolagenog omotača nastavlja da se isteže (Slika 41). Kako je sloj laminata osetljiviji na istežanje od kolagene osnove, kada se dostigne vrednost za izduženje pri kidanju odgovarajućeg biofilma dolazi do narušavanja laminiranog materijala. Iako kolagena osnova ne puca pri ovim vrednostima sile i izduženja, ove vrednosti treba usvojiti kao prava zatezna svojstva laminiranog omotača, jer za veće vrednosti sile i izduženja više ne postoji laminirani omotač, već samo kolageni omotač.



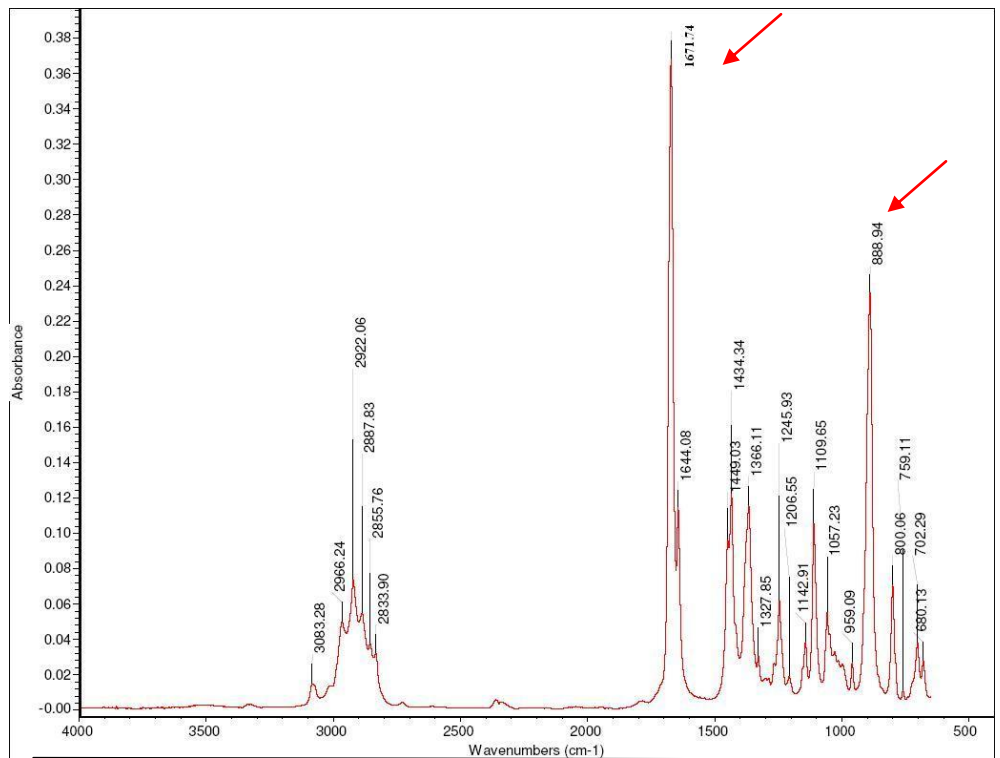
**Slika 41. Odvajanje i pucanje sloja laminata tokom testa zateznih svojstava laminiranih omotača**

Razmatranjem fizičko-hemijskih svojstava biofilma i laminiranog omotača sa 0.8% EUK, može se zapaziti da se ova svojstva, koja se odnose na osetljivost filma prema delovanju vlage ne razlikuju od istih svojstava filma sa 0.8% EUO ( $p > 0.05$ ). U odnosu na premaz primenjen u prvom eksperimentu, jedina uočena značajna razlika je u nižoj vrednosti sposobnosti bubrenja biofilma sa EUK ( $p < 0.05$ ). Poređenjem barijernih svojstava prema vodenoj pari, uočava se da tek u interakciji sa kolagenim omotačem, povećan sadržaj EUK i EUO u sloju laminata dovodi do smanjenja brzine propustljivosti vodene pare ( $p < 0.05$ ). Kod samih biofilmova se ova razlika ne uočava. Slični rezultati su u prvom eksperimentu objašnjeni kao izbalansiranost različitih faktora koji deluju na smanjenje, odnosno povećanje propustljivosti vodene pare kroz biofilm. Priroda ulja u ovom eksperimentu nije uticala na brzinu propustljivosti vodene pare kroz biofilmove, kao ni kroz laminirane kolagene omotače. Propustljivost za gasove je određena samo za laminirani kolageni omotač, jer zbog mehaničkih svojstava biofilma sa 0.8% etarskog ulja nije bilo moguće, primenom navedene metode, odrediti propustljivost za gasove. Poredeći vrednosti propustljivosti za gasove omotača primenjenog u prvom eksperimentu, sa 0.2% EUO i omotača sa 0.8% EUK, kao i omotača sa 0.8% EUO, zapažena je samo manja razlika u propustljivosti za ugljendioksid ( $p < 0.05$ ). Ukupno, u odnosu na laminirani omotač korišćen u prethodnom eksperimentu sa 0.2% EUO, dobijeni laminirani omotač sa 0.8% EUK je veće debljine, manje zatezne jačine (imajući u vidu zateznu jačinu biofilma), manje sposobnosti bubrenja i manje brzine propustljivosti vodene pare.



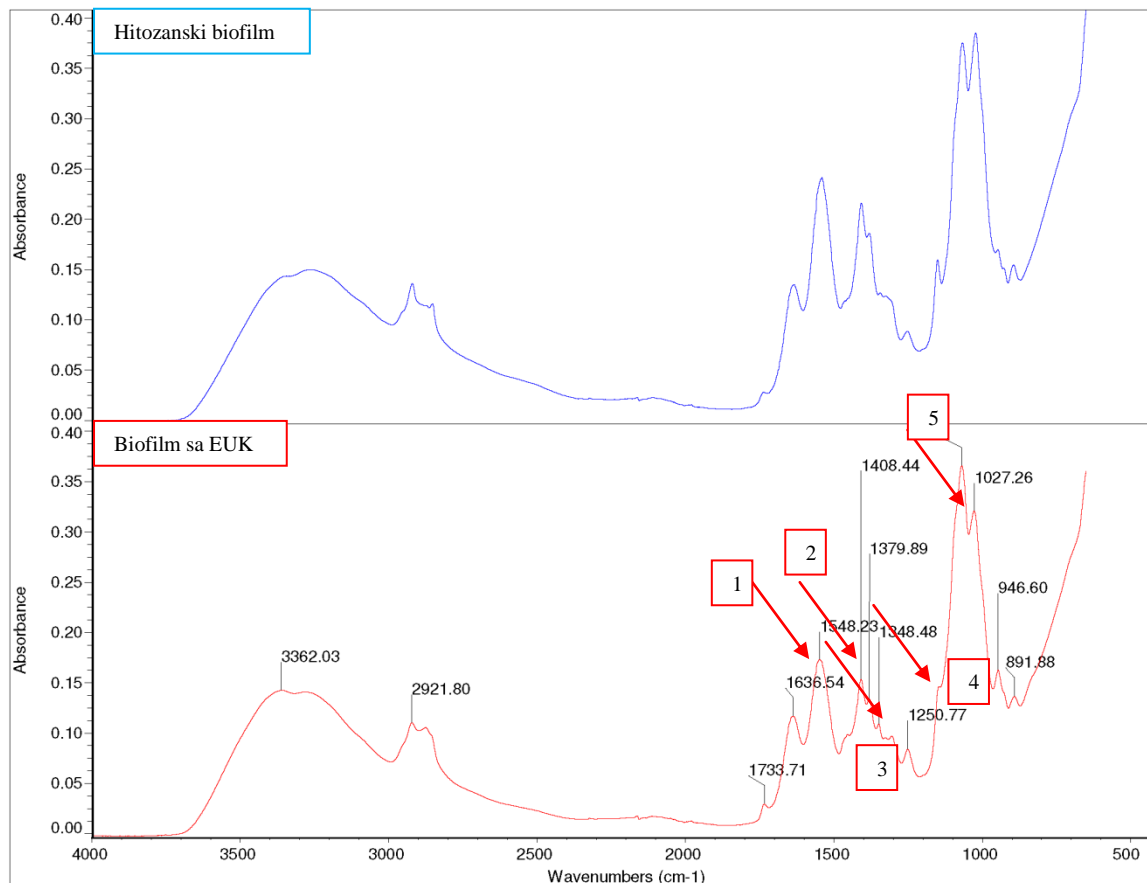
## Određivanje strukture ATR-FTIR spektrofotometrijom

Na Slikama 42. i 43. prikazani su rezultati strukturne analize hitozanskog biofilma sa dodatkom EUK.



Slika 42. ATR-FTIR spektar EUK (strelice ukazuju na karakteristične pikove)

Prvo je prikazana struktura i karakteristične grupe samog EUK (Slika 42), a zatim je razmatran uticaj dodatka EUK na strukturu samog hitozanskog biofilma (Slika 43). Prema brojnim literaturnim podacima, osnovni sastojci etarskog ulja kima, koji su ujedno nosioci njegove bioaktivnosti su karvon i limonen. Fu i Lim (2012) su identifikovali snažan pik na  $887\text{ cm}^{-1}$  i dodelili je snažnoj vibraciji van ravni grupe  $=\text{CH}_2$  koja im je poslužila za identifikaciju limonena. Ova grupa odgovara izraženom pik u spektru EUK na  $888.94\text{ cm}^{-1}$  (Slika 42). Za apsorpcioni maksimum na  $1673\text{ cm}^{-1}$  autori su zapazili da ne postoji u spektru limonena, već da potiče od vibracije veze  $\text{C}=\text{O}$ , koja predstavlja osnovnu razliku u strukturi limonena i karvona i može se koristiti za identifikaciju karvona (Obadiah *i sar.*, 2012). Na Slici 42., ova traka je identifikovana na  $1671.74\text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 43. ATR-FTIR spektar hitozanskog biofilma i hitozanskog biofilma sa EUK (strelicama su naznačeni pikovi na kojima je uočena**

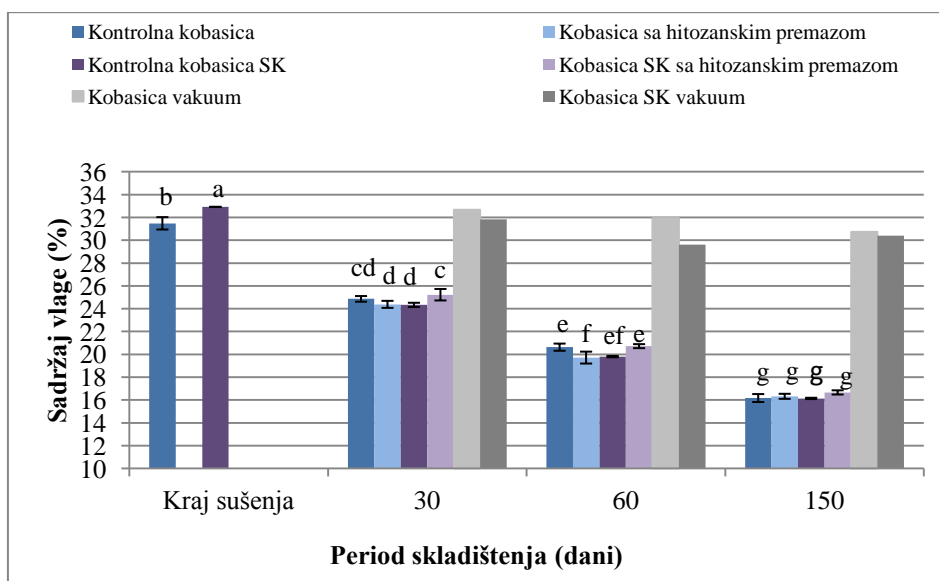
Na *Slici 43.* je prikazan spektar hitozanskog biofilma i hitozanskog biofilma sa EUK radi poređenja. Na *Slici 43.* su označene promene u spektru hitozana, koje su nastale kao posledica inkorporiranja EUK. Pikovi koji označavaju strukturu hitozonijum acetata, na talasnim dužinama  $1548.23\text{ cm}^{-1}$  i  $1408.44\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}_3^+$  grupa i  $-\text{COO}^-$  grupa) su uočeni i u spektru filma sa EUO, ali smanjenog intenziteta, što može značiti smanjen broj ove dve najreaktivnije grupe usled interakcija sa komponentama ulja (na *Slici 43* označeno brojevima 1 i 2). Na  $1348.48\text{ cm}^{-1}$  je uočen nov pik slabog intenziteta (označen brojem 3) koji najverovatnije potiče od deformacije C-C veze. Ovaj pik je karakterističan za prisustvo aromatičnog prstena, najverovatnije iz komponenata EUO (Dilamian *i sar.*, 2013). Brojem 4 je na *Slici 43.* označena promena na piku oko  $1148\text{ cm}^{-1}$  koji je dodeljen C-O-C vibraciji simetričnog istežanja. Intenzitet ovog pika u spektru hitozanskog filma sa EUO je smanjen u odnosu na hitozanski film. Uočena je takođe i promena u izgledu pikova na  $1058.59\text{ cm}^{-1}$  i  $1027.26\text{ cm}^{-1}$ , koji vode poreklo od C-O vibracije istežanja u C-OH grupama na trećem i šestom C atomu (Sionkowska *i sar.*, 2004; Liu *i sar.*, 2013; Leceta *i sar.*, 2013; Zivanovic *i sar.*, 2007; Souza *i sar.*, 2011; Dilamian *i sar.* 2013). Ipak, sve uočene promene se ne mogu opisati kao značajne, jer je koeficijent korelacije između ova dva spektra 0.9423, što ukazuje da nema značajnih promena u spektru hitozana.

#### 4.2.2. Primena hitozanskog premaza sa dodatkom etarskog ulja kima u zaštiti Petrovačke kobasice ("Petrovská kolbása")

Formiran i okarakterisan premaz na bazi hitozana sa 0.8% EUK je primenjen za zaštitu fermentisanih suvih kobasica. Primenjeni premaz je na kolagenom omotaču pokazao veću debljinu, ali manju zateznu jačinu, manju sposobnost bubrenja i manju brzinu propustljivosti vodene pare uz očuvanu nisku vrednost propustljivosti za gasove. Kao i u prvom eksperimentu, u analizi uticaja zaštitnog premaza na bazi hitozana uz dodatak EUK na održivost Petrovačke kobasice ispitani su: sadržaj vlage, vrednost pH, instrumentalno određivanje boje, masnokiselinski sastav, sadržaj malondialdehida, sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida i senzorski profil mirisa i ukusa. Za pojedina svojstva je, radi poređenja, uz kontrolnu kobasicu i kobasicu zaštićenu slojem hitozana, prikazana i kobasica upakovana u vakuumu (Šojić, 2013; Petrović *i sar.*, 2011).

##### Sadržaj vlage

Sadržaj vlage u kobasicama sa i bez starter kulture prikazan je na *Grafiku 16*. Na kraju sušenja je sadržaj vlage u kobasicama bio različit ( $p < 0.05$ ). U kontrolnoj kobasici SK je sadržaj vlage bio nešto viši ( $32.92 \pm 0.01$  %) u odnosu na kobasicu bez dodate starter kulture ( $31.48 \pm 0.54$  %). Obe kobasice su, prema vrednostima ovog parametra, zadovoljile zahtev Pravilnika o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa ("Sl. glasnik RS", br. 31/2012 i 43/2013, Član 47.).



**Grafik 16.** Sadržaj vlage (%) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka SK stoji uz kobasicu sa starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d, e, f, g označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

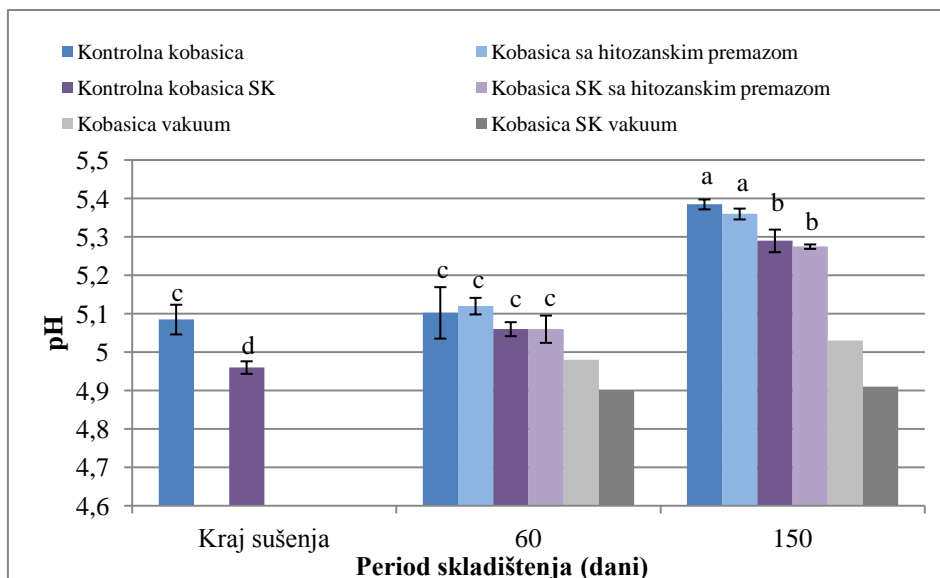
Tokom skladištenja je došlo do opadanja sadržaja vlage, kako u kontrolnoj kobasici, tako i u kontrolnoj kobasici SK i već nakon 30 dana se gubi razlika između sadržaja vlage ove dve kobasice ( $p > 0.05$ ), a vrednosti sadržaja vlage su iznosile ( $24.86 \pm 0.25$ )%, za kontrolnu kobasicu, i ( $24.33 \pm 0.19$ )%, za kontrolnu kobasicu SK. Do kraja perioda skladištenja od 150

dana, nije bilo razlike u sadržaju vlage između dve kontrolne kobasice. Sadržaj vlage je iznosio ( $16.17 \pm 0.35$ )%, za kontrolnu kobasicu, i ( $16.13 \pm 0.05$ )%, za kontrolnu kobasicu SK. Zaštitni hitozanski premaz sa 0.8% EUK nije doveo do usporavanja gubitka vlage ni kod jedne kobasice. Isti rezultati su dobijeni i za premaz sa 0.2% EUO, u prethodnom eksperimentu. Primena više koncentracije ulja, od 0.8%, u hitozanskom filmu, iako je dovela do smanjenja brzine propustljivosti vodene pare kroz laminirane omotače, u primeni nije dovela do značajne promene brzine smanjenja sadržaja vlage u kobasici ( $p < 0.05$ ).

### Vrednost pH

Na kraju procesa sušenja je uočena razlika ( $p < 0.05$ ) u vrednosti pH (Grafik 17) između kobasice sa dodatom starter kulturom ( $4.96 \pm 0.02$ ) i kobasice bez dodate starter kulture ( $5.09 \pm 0.04$ ). U kontrolnoj kobasici tokom skladištenja, kao i kod kontrolne kobasice iz prve sezone, dolazi do porasta pH, ali je ovde taj porast slabije izražen, tako da nakon 60 dana skladištenja nije došlo do promene pH ( $p < 0.05$ ). Promena je uočena tek nakon 150 dana skladištenja ( $p < 0.05$ ), kada je vrednost pH kontrolne kobasice bila  $5.39 \pm 0.01$ . Kod kontrolne kobasice SK je takođe došlo do porasta vrednosti pH, ali je ovaj porast ( $p < 0.05$ ) uočen već nakon 60 dana skladištenja ( $pH = 5.06 \pm 0.02$ ) i vrednost pH je nastavila da raste ( $p < 0.05$ ) do 150. dana ( $5.29 \pm 0.03$ ). Nakon uočene početne razlike u vrednostima pH kontrolne kobasice i kontrolne kobasice SK, ove vrednosti su se nakon 60 dana skladištenja izjednačile ( $p > 0.05$ ), da bi na kraju perioda skladištenja od 150 dana, vrednost pH kontrolne kobasice bila opet viša od vrednosti za kontrolnu kobasicu SK ( $p < 0.05$ ).

Za razliku od kobasice premazane zaštitnim slojem hitozana sa 0.2% EUO, kod koje je došlo do promene u trendu porasta vrednosti pH kontrolne kobasice, premazivanje zaštitnim slojem hitozana sa 0.8% EUK, nije dovelo do promene u vrednostima pH kontrolne kobasice, kao ni kontrolne kobasice SK, tokom čitavog perioda skladištenja. Porast vrednosti pH tokom skladištenja je, kao što je objašnjeno kod kobasica iz prve sezone, najverovatnije, posledica razgradnje mlečne kiseline do koje dolazi nakon što se potroše šećeri, i/ili izraženoj proteolitičkoj aktivnosti prisutne mikroflore (*Staphylococcus* spp.) uz formiranje peptida, amino kiselina i amonijaka (Saláková *i sar.*, 2010; Kamenik *i sar.*, 2012; Komprda *i sar.*, 2001; Bover-Cid *i sar.*, 1999). Uz kontrolne i kobasice sa zaštitnim premazom hitozana, dat je i prikaz vrednosti pH u kontrolnoj kobasici i kontrolnoj kobasici SK koje su upakovane u barijerne materijale u uslovima vakuuma (Šojić, 2013). Kod ovih kobasica je trend promene pH tokom skladištenja potpuno drugačiji u odnosu na kontrolne kobasice i kobasice sa slojem hitozana. Naime, kod kobasica upakovane pod vakuumom, pH tokom skladištenja na raste, već opada slabim intenzitetom. Ovaj pad vrednosti pH je najverovatnije u vezi sa povećanjem broja psihrofilnih laktobacila koji su preovlađujuća grupa mikroorganizama u mesu i proizvodima od mesa, skladištenim u ambalaži pod vakuumom na temperaturi frižidera (Mantis *i sar.*, 2007; Kato *i sar.*, 2000)



**Grafik 17.** Vrednost pH u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka SK stoji uz kobasicu sa starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

### Instrumentalno određivanje boje

Rezultati instrumentalnog određivanja boje Petrovačke kobasice prikazani su u *Tabeli 14*. Prema kriterijumima propisanim u *Elaboratu (Petrović i sar., 2007)* boja površine kobasica, odnosno boja omotača zbog specifičnog postupka dimljenja (vrste drveta) treba da je mrkocrvena (mahagonij) prijatna i ujednačena. Ako se promena boje površine svih kobasica posmatra tokom vremena skladištenja, uočava se da nije došlo do statistički značajne promene svetloće, udela crvene, niti udela žute boje, ni kod jedne od ispitivanih kobasica ( $p < 0.05$ ). Ovaj rezultat je sličan rezultatu dobijenom u prethodnom eksperimentu, gde se udeo žute i crvene boje nije menjao tokom skladištenja, a jedine promene su uočene kod parametra svetloće kobasice ( $L^*$ ), i to posebno kod kobasice sa hitozanskim premazom.

Upoređivanjem vrednosti za  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  površine kod kontrolne kobasice i kontrolne kobasice SK, vidi se da dodatak komercijalne starter kulture nije uticao na boju površine Petrovačke kobasice, kako na kraju sušenja, tako ni tokom skladištenja. Ukoliko se uporede vrednosti parametara boje površine na kraju sušenja u ovom i prethodnom eksperimentu (*Tabela 14* i *Grafik 10*) može se uočiti da su vrednosti parametra  $L^*$  i  $b^*$  na kraju sušenja približni, a da je udeo crvene boje ( $a^*$ ) u ovom eksperimentu nešto niži u odnosu na prethodni. Nanošenjem hitozanskog premaza na kontrolnu kobasicu i kontrolnu kobasicu SK, došlo je do značajnog ( $p < 0.05$ ) povećanja svetloće površine kobasice, dok su udeo crvene i žute boje ostali nepromenjeni ( $p < 0.05$ ). Posmatrajući promenu boje površine do koje je došlo nanošenjem hitozanskog premaza sa EUK, u odnosu na boju površine sa hitozanskim premazom sa EUO, uočava se da je promena svetloće površine izraženija kod premaza sa EUK. Novonastala boja površine je takođe i stabilnija kod premaza sa EUK u odnosu na premaz sa EUO gde je došlo do opadanja vrednosti  $L^*$  tokom skladištenja. Razlog ove razlike u boji može biti priroda etarskog ulja, ali i viša koncentracija ulja koja je upotrebljena kod EUK.

Tabela 14. Parametri boje:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  spoljne površine preseka u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja

Kontrolna kobasica						
Period skladištenja (dani)	presek			spoljna površina		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Kraj sušenja	33.97 <sup>a</sup> ±4.43	15.26 <sup>ab</sup> ±3.74	17.71 <sup>ab</sup> ±4.82	24.14 <sup>b</sup> ±1.59	7.83 <sup>a</sup> ±1.99	6.87±1.98
30	30.46 <sup>abc</sup> ±2.08	14.93 <sup>b</sup> ±3.19	15.44 <sup>ab</sup> ±2.41	23.15 <sup>b</sup> ±1.01	5.99 <sup>abc</sup> ±1.24	6.05±1.20
60	27.89 <sup>bcd</sup> ±2.84	15.93 <sup>ab</sup> ±3.91	15.28 <sup>ab</sup> ±5.66	23.26 <sup>b</sup> ±1.71	5.19 <sup>abc</sup> ±1.16	6.88±0.87
150	24.30 <sup>d</sup> ±3.57	16.92 <sup>ab</sup> ±3.15	17.82 <sup>ab</sup> ±4.34	22.40 <sup>b</sup> ±1.50	5.10 <sup>abc</sup> ±1.54	6.96±1.66
Kontrolna kobasica SK						
Period skladištenja (dani)	presek			spoljna površina		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Kraj sušenja	32.87 <sup>ab</sup> ±3.26	20.53 <sup>a</sup> ±1.18	21.22 <sup>a</sup> ±2.54	21.86 <sup>b</sup> ±1.33	7.12 <sup>ab</sup> ±1.93	6.05±1.47
30	29.67 <sup>abc</sup> ±2.31	19.86 <sup>a</sup> ±2.88	16.34 <sup>ab</sup> ±3.01	22.99 <sup>b</sup> ±1.16	6.17 <sup>abc</sup> ±1.14	6.28±1.40
60	26.72 <sup>cd</sup> ±1.65	14.83 <sup>b</sup> ±2.31	13.69 <sup>b</sup> ±2.93	23.03 <sup>b</sup> ±1.39	5.64 <sup>abc</sup> ±1.22	6.55±0.64
150	29.89 <sup>abc</sup> ±4.50	7.04 <sup>c</sup> ±1.34	13.35 <sup>b</sup> ±2.97	23.19 <sup>b</sup> ±1.66	5.30 <sup>abc</sup> ±1.50	6.64±1.22
Kobasica sa hitozanskim premazom						
Period skladištenja (dani)	presek			spoljna površina		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
30	30.16 <sup>abc</sup> ±2.16	18.82 <sup>ab</sup> ±2.55	17.05 <sup>ab</sup> ±3.14	28.63 <sup>a</sup> ±1.11	4.16 <sup>abc</sup> ±1.20	5.40±0.26
60	27.26 <sup>cd</sup> ±4.07	15.86 <sup>ab</sup> ±2.34	16.69 <sup>ab</sup> ±1.97	29.50 <sup>a</sup> ±2.41	2.55 <sup>c</sup> ±0.68	4.05±1.10
150	28.50 <sup>abcd</sup> ±4.02	9.60 <sup>c</sup> ±3.04	14.06 <sup>b</sup> ±4.63	29.33 <sup>a</sup> ±2.69	4.40 <sup>bc</sup> ±2.79	6.80±1.52
Kobasica SK sa hitozanskim premazom						
Period skladištenja (dani)	presek			spoljna površina		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
30	30.73 <sup>abc</sup> ±2.47	19.92 <sup>a</sup> ±3.13	17.14 <sup>ab</sup> ±3.41	28.53 <sup>a</sup> ±1.61	4.72 <sup>abc</sup> ±1.52	6.25±2.52
60	24.98 <sup>d</sup> ±4.29	19.16 <sup>ab</sup> ±5.08	16.48 <sup>ab</sup> ±4.83	28.77 <sup>a</sup> ±2.04	4.19 <sup>abc</sup> ±0.56	4.77±0.16
150	26.14 <sup>cd</sup> ±2.91	16.76 <sup>ab</sup> ±4.57	16.48 <sup>ab</sup> ±6.10	25.97 <sup>ab</sup> ±0.85	5.88 <sup>abc</sup> ±1.09	7.48±0.39
Kobasica vakuum						
Period skladištenja (dani)	presek			spoljna površina		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
30	32.91	19.75	17.41	-	-	-
60	32.14	21.30	20.26	-	-	-
150	29.77	18.72	18.41	-	-	-
Kobasica SK vakuum						
Period skladištenja (dani)	presek			površina		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$a^*$	$b^*$
30	32.80	21.34	18.33	-	-	-
60	29.71	21.33	19.16	-	-	-
150	30.34	22.48	20.82	-	-	-

Različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti u koloni ( $p < 0.05$ ).

Kada se posmatra promena boje preseka kobasica tokom skladištenja, uočava se različit trend promene boje kod kontrolne kobasice u odnosu na kontrolnu kobasicu SK. Kod preseka kontrolne kobasice dolazi do opadanja vrednosti  $L^*$  tokom čitavog perioda skladištenja, dok vrednosti  $a^*$  i  $b^*$  ostaju nepromenjene. Kod preseka kontrolne kobasice SK vrednost  $L^*$  opada do 60. dana skladištenja, nakon čega dolazi do porasta vrednosti ovog parametra, a vrednosti  $a^*$  i  $b^*$  opadaju tokom čitavog perioda skladištenja. U prethodnom

eksperimentu su promene parametara boje preseka negde između trenda ove dve kobasice. Kod preseka kobasice sa hitozanskim premazom je zapažena značajna razlika u vrednostima parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu kobasicu. Došlo je do povećanja srednje vrednosti  $L^*$  i sniženja vrednosti  $a^*$  i  $b^*$  nakon 5 meseci skladištenja. Najizraženija razlika je bila u vrednosti  $a^*$ , između  $16.92 \pm 3.15$ , kod kontrolne i  $9.60 \pm 3.04$ , kod kobasice sa hitozanskim premazom. Tokom procesa sušenja i zrenja dolazi do smanjenja udela crvene boje ( $a^*$ ), jer nastaje veća količina mlečne kiseline koja denaturiše mioglobin i nitrozilmioglobin. Takođe, povećanjem koncentracije NaCl, dovodi do oksidacije nitrozilmioglobina i utiče na smanjenje udela crvene boje ( $a^*$ ) (Papadima i Bloukas, 1999). Ipak, najbitniji uticaj na udeo crvene boje ( $a^*$ ) na preseku kobasica ima crvena začinska paprika, koja svojom dominantnom bojom utiče na formiranje crvene boje fermentisane Petrovačke kobasice. Nitrati iz paprike, takođe, imaju važnu ulogu u formiranju boje tradicionalnih fermentisanih kobasica. Bakterijskom redukcijom iz nitrata nastaju nitriti koji iako se nalaze u maloj količini, sa mioglobinom mogu da grade stabilan pigment nitrozilmioglobin (Papadima i Bloukas, 1999; Fista *i sar.*, 2004; Vuković *i sar.*, 2011). Nasuprot tome neminovno je da kod crvene začinske paprike dolazi do diskolorativnih promena kao posledica oksidativnih i mikrobioloških promena u fermentisanim kobasicama (Gimeno *i sar.*, 2000; Fernández López *i sar.*, 2002; Škaljac, 2014; Martinez *i sar.*, 2007; Rohlík *i sar.*, 2013). Smanjenje udela žute boje ( $b^*$ ) tokom fermentacije i zrenja na preseku kobasica po mišljenju nekih autora dovodi se u korelaciju sa mikroorganizmima koji tokom fermentacije koriste kiseonik i tako se smanjuje količina oksimioglobina koji povoljno utiče na udeo žute boje ( $b^*$ ) u proizvodu (Pérez-Alvarez *i sar.*, 1999; Bozkurt i Bayram, 2006). Gimeno *i sar.* (2001), kao i Pérez-Alvarez *i sar.* (1999) zaključili su da viši sadržaj NaCl i više vrednosti pH utiču na manji udeo žute boje ( $b^*$ ). Po mišljenju Fernández-Lópeza *i sar.* (2002), za razliku od udela crvene boje ( $a^*$ ), gde je utvrđeno da dominantan uticaj ima crvena začinska paprika dodata u nadev španske fermentisane kobasice, promene udela žute boje ( $b^*$ ) i vrednosti udela žute boje ( $b^*$ ) su posledica kombinovanog delovanja začinske paprike i žutih komponentata mesa.

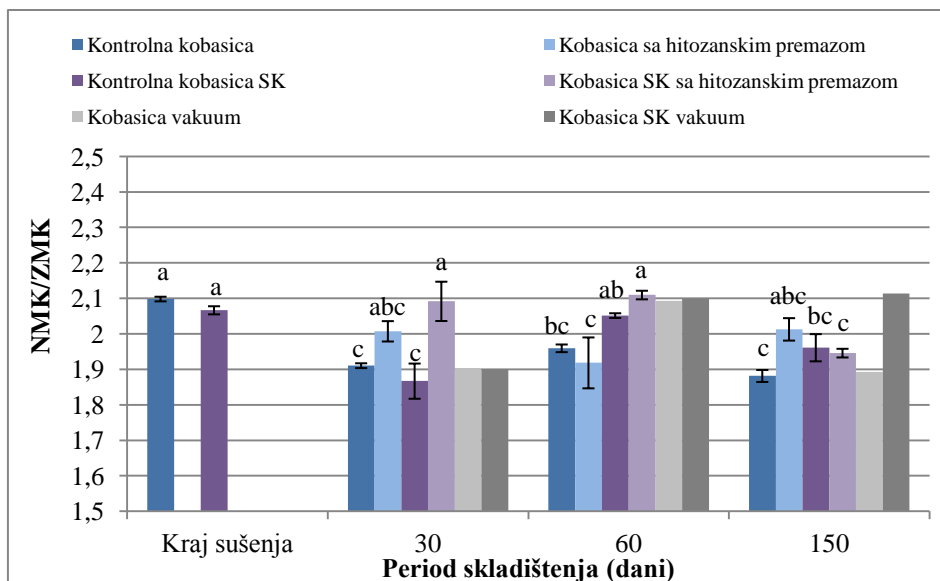
Poredeći vrednosti parametara boje preseka za kontrolnu kobasicu SK i kobasicu SK sa hitozanskim premazom, zapaža se da su vrednosti  $L^*$  numerički niže kod kobasice SK sa hitozanskim premazom, iako nema statistički značajne razlike. Takođe, kod kobasice SK sa hitozanskim premazom nema porasta  $L^*$  vrednosti na kraju skladištenja, a vrednosti  $a^*$  i  $b^*$  ove kobasice ostaju slične ( $p > 0.05$ ) vrednostima na kraju sušenja tokom čitavog perioda skladištenja. Zaštitni efekat hitozanskog premaza sa EUK je uočen kod kobasice SK sa hitozanskim premazom, dok je kod kobasice sa hitozanskim premazom došlo čak do izraženije promene boje u odnosu na kontrolnu i samo je vrednost  $L^*$  bila očuvana na nivou bliskom vrednostima na kraju sušenja.

### **Masnokiselinski sastav**

Važan parameter nutritivnog kvaliteta Petrovačke kobasice, odnos sadržaja nezasićenih i zasićenih masnih kiselina, dat je na *Grafiku 18*. Prikazane su i vrednosti ovog parametra i za kobasice skladištene u ambalaži pod vakuumom (Šojić, 2013; Petrović *i sar.*, 2011). Na kraju sušenja, odnos NMK/ZMK je isti u kontrolnoj kobasici i kontrolnoj kobasici

SK ( $p > 0.05$ ) i ovo je maksimalna vrednost ovog pokazatelja za ukupni period skladištenja. U obe kontrolne kobasice odnos NMK/ZMK tokom skladištenja opada, ali je u kontrolnoj kobasici SK ovaj trend slabije izražen u odnosu na kontrolnu kobasicu. Ova razlika je objašnjena kao posledica dejstva antioksidativnih enzima koji štite polinezasićene masne kiseline, a koje proizvode bakterije vrsta *Staphylococcus xylosum* i *Staphylococcus carnosus*, koje su sadržane u korišćenoj komercijalnoj starter kulturi (Šojić, 2013.). Opadajući trend odnosa NMK/ZMK je u skladu sa rezultatima koji su dobijeni za ovu kobasicu, a koji pokazuju da tokom skladištenja dolazi paralelno do povećanja sadržaja zasićenih masnih kiselina (miristinska, palmitinska, margarinska, stearinska) i opadanja sadržaja nezasićenih masnih kiselina (palmitoleinska, oleinska, eikosenska, linolna i linolenska) (Šojić, 2013). Ukoliko uporedimo vrednosti ovog parametra kod kobasica sa hitozanskim premazom sa 0.8% EUK i kontrolnih kobasica, može se uočiti da je zaštitni premaz doveo do očuvanja nezasićenih masnih kiselina u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, što je posebno uočljivo nakon 30 dana skladištenja za obe kobasice i nakon 150 dana skladištenja za kontrolnu kobasicu. Poredeći kobasicu skladištenu u ambalaži pod vakuumom i kobasicu sa hitozanskim premazom, uočava se da su vrednosti odnosa NMK/ZMK više kod kobasice sa hitozanom tokom većeg dela skladištenja (osim 60. dana). Kod kobasice SK je trend nešto drugačiji, pa je 30. dana viša vrednost NMK/ZMK kod kobasice SK sa hitozanom, 60. dana se vrednosti izjednačuju, da bi na kraju perioda skladištenja odnos NMK/ZMK bio viši u kobasici SK skladištenoj u ambalaži pod vakuumom. Kod kontrolne kobasice zaštićene slojem hitozana sa 0.2% EUO uočene su minimalne razlike ( $p > 0.05$ ), koje govore u prilog pozitivnog efekta zaštitnog premaza u očuvanju nutritivno visokovrednih nezasićenih masnih kiselina, dok su kod premaza sa 0.8% EUK ove razlike izraženije. Posebno je važna mogućnost očuvanja polinezasićenih masnih kiselina (linolne i linolenske) koje su najnestabilnije i lako podležu oksidaciji (Valencia *i sar.*, 2006). Krkić *i sar.* (2013) su pokazali niži stepen degradacije ovih kiselina, posebno linolenske u Petrovačkoj kobasici zaštićenoj hitozanskim premazom sa 0.8% EUK. Zaštita nezasićenih masnih kiselina od oksidacije premazivanjem slojem hitozana i EUK je najverovatnije posledica zbira zaštitnog (antioksidativnog) delovanja hitozana i EUK, kao i dobre barijere za kiseonik koju čini hitozanski film (Park *i sar.*, 2004; Peng, 1998; Camo *i sar.*, 2011; Mohan *i sar.*, 2012).

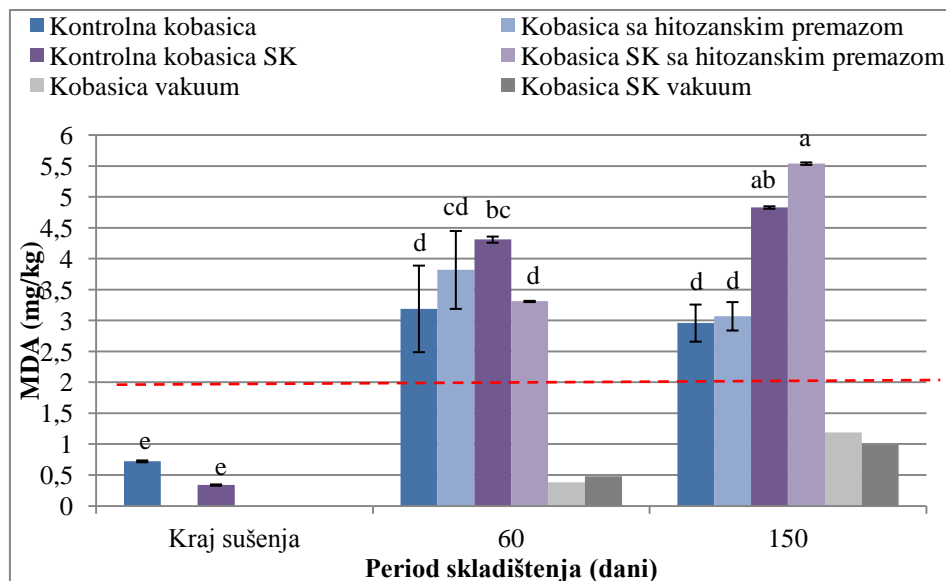




**Grafik 18. Odnos sadržaja nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka SK stoji uz kobasicu sa starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).**

### Sadržaj malondialdehida (TBARS test)

Na kraju sušenja je sadržaj MDA (Grafik 19) u kontrolnoj kobasici bio ( $0.72 \pm 0.02$ ) mg/kg, dok je u kontrolnoj kobasici SK vrednost sadržaja MDA bila ( $0.34 \pm 0.01$ ) mg/kg. Iako je postojala numerička razlika u sadržaju MDA na kraju sušenja u kontrolnim kobasicama, ova razlika nije bila statistički značajna ( $p > 0.05$ ). Dobijene vrednosti sadržaja malondialdehida u obe kobasice su slične vrednostima koje su dobili Rubio *i sar.* (2008) i Ruiz-Moyano *i sar.* (2011), za fermentisane suve kobasice, a više nego vrednosti dobijene u radovima Valencia *i sar.* (2006) i Ercoşkun i Özkal (2011). Nakon 60 dana skladištenja došlo je do značajnog povećanja sadržaja MDA u obe kontrolne kobasice, a ovaj porast je bio izraženiji u kontrolnoj kobasici SK ( $p < 0.05$ ), pa su vrednosti sadržaja MDA bile ( $3.19 \pm 0.7$ ) mg/kg u kontrolnoj kobasici i ( $4.31 \pm 0.05$ ) mg/kg u kontrolnoj kobasici SK. U daljem toku skladištenja, do 150. dana vrednost sadržaja MDA u kontrolnim kobasicama se nije značajno menjala, u odnosu na sadržaj MDA utvrđen 60. dana ( $p > 0.05$ ). Kod kobasice bez dodate komercijalne starter kulture, nanošenje zaštitnog premaza na bazi hitozana sa EUK nije dovelo do smanjenja utvrđenog sadržaja MDA tokom skladištenja, dok je kod kobasice SK sa hitozanskim premazom uočena razlika. Nakon 60 dana skladištenja, sadržaj MDA u kontrolnoj kobasici SK je bio ( $4.31 \pm 0.05$ ) mg/kg i bio je statistički značajno veći ( $p < 0.05$ ) u odnosu na sadržaj MDA utvrđen u kobasici SK sa hitozanskim premazom, ( $3.31 \pm 0.01$ ) mg/kg. Nakon 150 dana skladištenja, razlika u sadržaju MDA kontrolne kobasice SK i kobasice SK sa hitozanskim premazom nije bila statistički značajno različita ( $p > 0.05$ ).



**Grafik 19.** Sadržaj malondialdehida (mg/kg) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka SK stoji uz kobasicu sa komercijalnom starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Obzirom da granica detekcije nepoželjnog mirisa na užegnuće, prema literaturnim podacima, odgovara vrednosti sadržaja MDA od 2 mg/kg u fermentisanim suvim kobasicama (označeno crvenom linijom na Grafiku 19), može se zaključiti da u svim ispitivanim kobasicama sadržaj MDA od 60. dana, pa do kraja perioda skladištenja, ukazuje na pojavu užegnuća (Ansorena i Astiasaran, 2004; Salgado *i sar.*, 2005; Valencia *i sar.*, 2006; Šojić, 2013). Ovako visoke vrednosti MDA su najverovatnije posledica visoke acidifikacije izazvane produkcijom mlečne kiseline i niskim vrednostima pH na početku skladištenja, gde dolazi do intenzivnog razmnožavanja heterofermentativnih laktobacila, koji pokazuju prooksidativno dejstvo (Leroy *i sar.*, 2006; Vasilev *i sar.*, 2010; Šojić, 2013). Istovremeno, pri niskom pH dolazi do odumiranja mikrokoka, bakterija koje poseduju izražen antioksidativni potencijal. Najverovatnije je, usled kombinacije ova dva trenda, u razvoju mikroflore kobasice došlo do izraženih oksidativnih promena tokom skladištenja kobasica (Leroy *i sar.*, 2006., Šojić, 2013). Niža početna vrednost pH kontrolne kobasice SK je dovela do višeg sadržaja MDA u ovoj kobasici tokom skladištenja. Efekat hitozanskog premaza sa EUK je uočljiv samo kod kobasice SK i, ukoliko se uporedi sa efektom hitozanskog premaza sa EUO, zaštitni efekat premaza sa EUK ima manje izraženo dejstvo. Moguće je da je ovo posledica razlike u antioksidativnom delovanju dva ulja, gde EUO, bez obzira na nižu primenjenu koncentraciju ima izraženije antioksidativno delovanje (Camo *i sar.*, 2011).

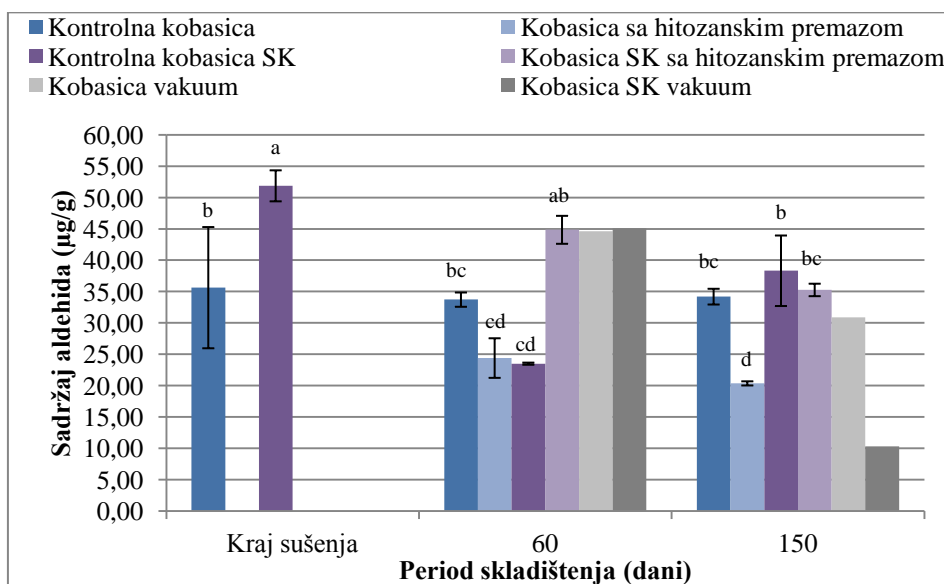
Sa druge strane, trend porasta MDA u kobasicama prve sezone (kada je bio primenjen hitozanski premaz sa EUO) je bio drugačiji. Do porasta MDA u kontrolnoj kobasici preko granice užegnuća je došlo tek nakon 150 dana skladištenja. Moguće je da je intenzitet i brzina porasta sadržaja MDA u kobasicama zaštićenim hitozanskim premazom sa EUK, koji je posledica vođenja procesa sušenja i zrenja, zamaskirao efekat ovog premaza. Sa *Grafika 19.* se vidi da je samo potpuno odsustvo kiseonika u ambalaži pod vakuumom bio, u ovom slučaju, dovoljan uslov da se Petrovačka kobasica tako niskog pH na kraju sušenja očuva

tokom ukupnog vremena skladištenja bez pojave užegnuća (Šojić, 2013; Petrović *i sar.*, 2011).

### Sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida

Aldehidi su važne isparljive supstance koje nastaju iz lipida i već pri niskim koncentracijama utiču značajno na miris proizvoda od mesa. Ovo je razlog zašto njihovo prisustvo i u tragovima utiče na specifičnu aromu proizvoda. Aldehidi mogu uticati na pojavu širokog spektra ukusa i mirisa (Sun *i sar.*, 2010). Tipičan proizvod degradacije linolenske kiseline i aldehyd koji je najviše zastupljen u sumi zasićenih alifatičnih aldehida Petrovačke kobasice je propanal (Šojić, 2013). Na kraju sušenja je utvrđena razlika ( $p < 0.05$ ) u sadržaju ukupnih aldehida u kontrolnoj kobasici, ( $35.63 \pm 9.67$ )  $\mu\text{g/kg}$  i kontrolnoj kobasici SK, ( $51.87 \pm 2.47$ )  $\mu\text{g/kg}$ . Kontrolna kobasica SK je imala viši sadržaj aldehida (Grafik 20). Razlika u sadržaju aldehida obe kobasice na kraju sušenja, u odnosu na kobasicu proizvedenu u prethodnoj sezoni, koja je korišćena u eksperimentu sa hitozanskim premazom sa EUO je bila izuzetno velika jer je vrednost sadržaja aldehida u prethodnom eksperimentu iznosila ( $4.54 \pm 0.90$ )  $\mu\text{g/kg}$ . Značajno viši sadržaj aldehida u kobasicama, prikazan na *Grafiku 20.* je, najverovatnije, kao i kod sadržaja MDA, pokazatelj izraženih oksidativnih promena na lipidima koji su posledica niske vrednosti pH na kraju sušenja i nešto više temperature tokom sušenja i zrenja. Tokom skladištenja od 150 dana, u kontrolnoj kobasici nije došlo do promene sadržaja ukupnih aldehida u odnosu na vrednosti utvrđene na kraju sušenja ( $p > 0.05$ ). U kontrolnoj kobasici SK je nakon 60 dana skladištenja došlo do značajnog ( $p < 0.05$ ) smanjenja vrednosti sadržaja aldehida na ( $23.51 \pm 0.17$ )  $\mu\text{g/kg}$ , najverovatnije kao posledica destrukcije nastalih aldehida i formiranja drugih razgradnih produkata ili zbog reakcije aldehida sa razgradnim produktima proteolize (Andrés *i sar.*, 2004; Qiu *i sar.*, 2013). Od 60. do 150. dana skladištenja u ovoj kobasici dolazi ponovo do porasta sadržaja aldehida ( $p < 0.05$ ), do ( $38.33 \pm 5.62$ )  $\mu\text{g/kg}$ . Premazivanjem kontrolne kobasice hitozanskim slojem sa EUK došlo je do značajnog sniženja sadržaja aldehida tokom čitavog perioda skladištenja ( $p < 0.05$ ), pa je tako nakon 60 dana skladištenja sadržaj aldehida u kontrolnoj kobasici bio ( $33.72 \pm 1.14$ )  $\mu\text{g/kg}$ , a u kobasici sa hitozanskim premazom ( $24.40 \pm 3.16$ )  $\mu\text{g/kg}$ , dok su na kraju skladištenja ove vrednosti bile ( $34.20 \pm 1.26$ )  $\mu\text{g/kg}$  za kontrolnu kobasicu i ( $20.36 \pm 0.33$ )  $\mu\text{g/kg}$  za kobasicu sa hitozanskim premazom. Ovaj rezultat je sličan rezultatu koji je postignut primenom hitozanskog premaza sa EUO. Sadržaj aldehida u kobasici sa hitozanskim premazom i EUK je bio niži čak i u odnosu na kobasicu skladištenu u ambalaži pod vakuumom. Kod kobasice SK sa hitozanskim premazom zaštitni efekat hitozana i EUK u očuvanju lipida kobasice, mereno sadržajem aldehida, nije registrovan. Nakon 60 dana skladištenja je sadržaj aldehida u kobasici SK sa hitozanskim premazom, od ( $44.86 \pm 2.23$ )  $\mu\text{g/kg}$  značajno viši ( $p < 0.05$ ) od sadržaja aldehida u kontrolnoj kobasici SK ( $23.51 \pm 0.17$ )  $\mu\text{g/kg}$ . Ovaj rezultat je u suprotnosti sa rezultatom dobijenim za sadržaj MDA, ali je moguće da je u kontrolnoj kobasici SK došlo do razgradnje nastalih aldehida na kraju sušenja, pa je iz tog razloga registrovan izrazito nizak sadržaj aldehida, koji realno ne odražava niži stepen lipidne oksidacije. Na kraju perioda skladištenja od 150 dana, numerička srednja vrednost sadržaja aldehida u kobasici SK sa hitozanskim premazom, od ( $35.27 \pm 0.99$ )  $\mu\text{g/kg}$  je niža u

odnosu na kontrolnu kobasicu SK, ( $38.33 \pm 5.62$ )  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ali ova razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ).



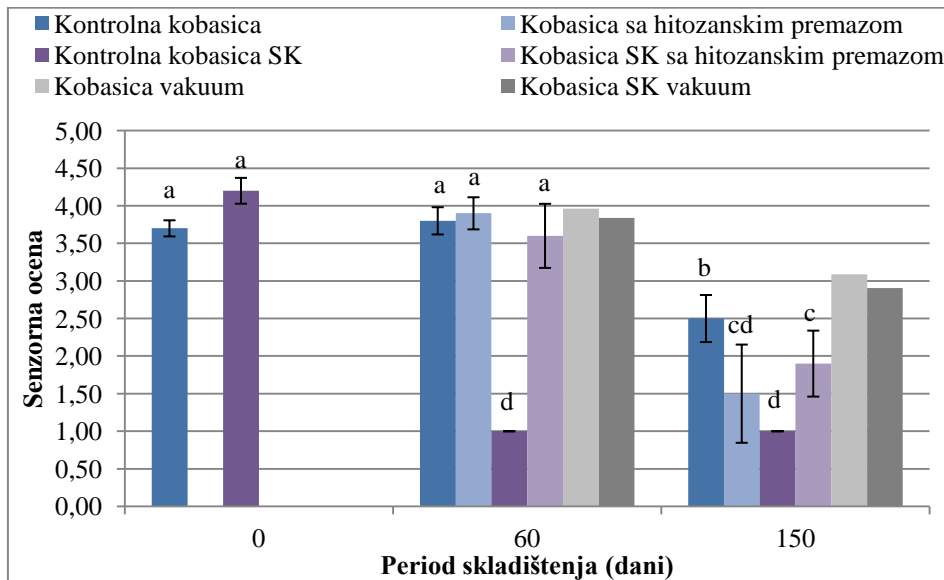
**Grafik 20.** Sadržaj ukupnih zasićenih alifatičnih aldehida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka SK stoji uz kobasicu sa starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

### Senzorska analiza profila mirisa i ukusa

Senzorski profil mirisa i ukusa je jedan od senzorskih profila koji su odlučujući u određivanju prihvatljivosti proizvoda od mesa od strane potrošača. Kako je prikazano na *Grafiku 21.*, kontrolna kobasica SK je imala senzorsku ocenu na kraju sušenja 4.20, a kontrolna kobasica 3.70. Iako je bilo razlike u numeričkoj vrednosti, statistički razlika nije bila značajna ( $p > 0.05$ ). Nakon 60 dana skladištenja je miris i ukus kontrolne kobasice ocenjen sa 3.80, a kobasice sa hitozanskim premazom 3.90, što je i najviša ocena za kobasicu bez dodate starter kulture tokom skladištenja. Za razliku od kobasice bez dodate starter kulture, miris i ukus kontrolne kobasice SK ocenjen je kao neprihvatljiv, ocenom 1, a takva ocena je dodeljena ovoj kobasici i na kraju skladištenja od 150 dana. Kod kobasice bez dodate starter kulture, hitozanski premaz nije doneo poboljšanje mirisa i ukusa tokom skladištenja.

Nakon 60 dana skladištenja nije bilo statistički značajne razlike u ocenama mirisa i ukusa kontrolne kobasice i kobasice sa hitozanskim premazom ( $p < 0.05$ ), iako je postojala numerička razlika u korist kobasice sa hitozanskim premazom. Nakon 150 dana skladištenja, kontrolna kobasica je čak imala višu senzorsku ocenu u odnosu na kobasicu sa hitozanskim premazom ( $p < 0.05$ ). Kod kobasice sa dodatom starter kulturom je tend promene senzorskog profila mirisa i ukusa sa i bez hitozanskog premaza bio znatno drugačiji ( $p < 0.05$ ). Nakon 60 dana je kontrolna kobasica SK bila odbačena sa neprihvatljivom ocenom 1, dok je kobasica SK sa hitozanskim premazom dobila ocenu 3.60, koja se nije značajno razlikovala ( $p < 0.05$ ) od ocene ove kobasice na kraju sušenja. Na kraju perioda skladištenja od 150 dana, senzorska ocena mirisa i ukusa kontrolne kobasice SK je i dalje bila 1 (kobasica odbačena kao neprihvatljiva), dok je kobasica SK sa hitozanskim premazom ocenjena statistički značajno

višom ocenom ( $p < 0.05$ ) od 1.9. Ako se uporede vrednosti senzorske ocene kobasica sa hitozanskim premazom i kobasica skladištenih pod vakuumom, razlika je uočljiva tek nakon 5 meseci skladištenja, kada su kobasice skladištene pod vakuumom bile ocenjene višim ocenama. Hitozanski premaz na kobasici SK u ovom eksperimentu je pokazao zaštitni efekat koji je uporediv sa efektom koji je pokazao hitozanski premaz sa EUO, sa tim da je aroma kima svojstvena i poželjna kod Petrovačke kobasice, u odnosu na aromu origana.

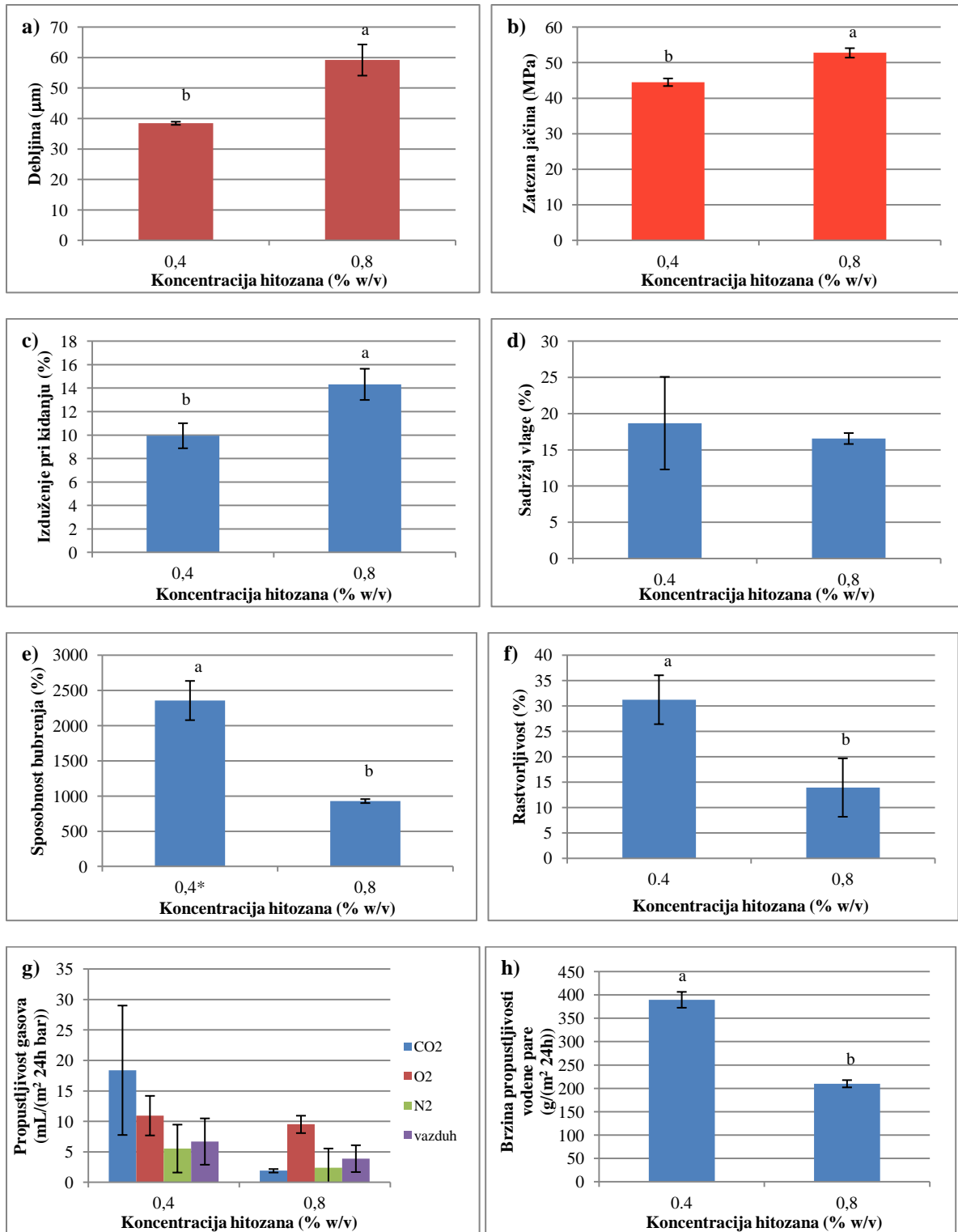


**Grafik 21.** Senzorska ocena mirisa i ukusa Petrovačke kobasice tokom skladištenja, oznaka SK stoji uz kobasicu sa starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Karakterizacija i primena hitozanskih biofilmova sa dodatkom etarskog ulja kima i pčelinjeg voska i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača

#### 4.3.1. Uticaj koncentracije hitozana na svojstva biofilma

Uticaj koncentracije visokoviskoznog hitozana u filmogenom rastvoru na mehanička, fizičko-hemijska i barijerna svojstva filma su prikazana na *Grafiku 22*. Uticaj veće koncentracije hitozana je bio značajan za većinu ispitivanih svojstava. Sva ispitivana mehanička svojstva, **debljina, zatezna jačina i izduženje pri kidanju filma** su, za istu masu filmogenog rastvora, bila veća kod filma sa većom koncentracijom hitozana ( $p < 0.05$ ). Iz rastvora hitozana koncentracije 0.4% (w/v), dobijen je film debljine  $(38 \pm 0.52) \mu\text{m}$ , a za 0.8% film debljine  $(59.22 \pm 5.11) \mu\text{m}$ . Pored povećanja vrednosti debljine filma, došlo je i do porasta vrednosti ostalih mehaničkih svojstava, zatezna jačina je za film sa 0.4% (w/v) hitozana iznosila  $(44.51 \pm 2.58) \text{MPa}$ , a za film sa 0.8% (w/v) hitozana  $(52.77 \pm 0.16) \text{MPa}$ . Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje je Sukkunta (2005) dobio za hitozanski film različite koncentracije hitozana u mlečnoj kiselini. Povećanje zatezne jačine i izduženja pri kidanju su promene koje su poželjne za predviđenu namenu, kao premaz za suve fermentisane kobasice. Ukoliko se analiziraju prikazana fizičko-hemijska svojstva koja opisuju osetljivost analiziranih filmova na vlagu, u ispitivanom opsegu, koncentracija hitozana u filmogenom rastvoru ima značajnu ulogu u smanjenju osetljivosti filma na dejstvo vlage ( $p < 0.05$ ). **Sadržaj vlage** je bio sličan u oba filma, ali je promena u sposobnosti bubrenja i u rastvorljivosti bila značajna. Na *Grafiku 22*, je umesto **sposobnosti bubrenja** filma sa 0.4% (w/v) hitozana, prikazan rezultat za film sa 0.4% (w/v) hitozana i 0.2% EUO, jer se film bez EUO delimično rastvorio u primenjenim uslovima ispitivanja, tako da rezultat za ovaj film nije dobijen. Imajući ovo u vidu, može se reći da je povećanjem koncentracije hitozana osetljivost filma prema delovanju vlage iz okoline značajno snižena. Analogno, **rastvorljivost filma** je opala za više od dva puta. Smanjenje osetljivosti filma prema delovanju vlage je takođe pozitivna i poželjna promena za predviđenu primenu ispitivanih filmova. Analiziranjem **barijernih svojstava za gasove i vodenu paru**, može se videti da je kod barijernih svojstava za gasove došlo do numeričke promene vrednosti, koja nije bila statistički značajna ( $p < 0.05$ ), dok je barijera za vodenu paru značajno poboljšana. Vrednost propustljivosti 0.4% hitozanskog filma za vodenu paru je bila  $(389.71 \pm 16.96) \text{g/m}^2 \text{24h}$ , a 0.8% hitozanskog filma  $(210.08 \pm 7.76) \text{g/m}^2 \text{24h}$ . Rezultati su u saglasnostima sa rezultatima za hitozanski film koncentracije 1% (w/v) i 2% (w/v) u 1% (v/v) sirćetnoj kiselini, koje su prikazali García i sar. (2004). Poređenjem svih analiziranih svojstava filmova na bazi hitozana u navedene dve koncentracije, za primenu u vidu omotača za suve fermentisane kobasice je opravdano koristiti koncentraciju hitozana od 0.8% (w/v).



**Grafik 22. Svojstva hitozanskih biofilмова u zavisnosti od koncentracije hitozana: a) Debljina ( $\mu\text{m}$ ); b) Zatezna jačina (MPa); c) Izduženje pri kidanju (%); d) Sadržaj vlage (%); e) Sposobnost bubrenja (%); f) Rastvorljivost (%); g) Propustljivost gasova ( $\text{mL}/(\text{m}^2 \text{ 24h bar})$ ); h) Brzina propustljivosti vodene pare ( $\text{g}/(\text{m}^2 \text{ 24h})$ ) (\* prikazan je rezultat za film: 0.4% hitozana i 0.2% EUO, jer se film bez EUO rastvorio u uslovima ispitivanja).**

#### 4.3.2. Karakterizacija hitozanskih biofilmova sa dodatkom etarskog ulja kima i pčelinjeg voska i odgovarajućih laminiranih kolagenih omotača

Pčelinji vosak je prirodni jestivi vosak. Koristi se kao aditiv E901u malim količinama za glaziranje, u cilju zaštite površine voća i zaštite od gubitka vlage iz hrane. Njegova jestivost se zasniva na činjenici da je nesvarljiv kao biljni voskovi, te zbog toga nepromenjen prolazi kroz digestivni trakt. U proizvodnji hrane, koristi se kao omotač za sireve, gde je pokazano da sprečava razvoj plesni, ali mu je osnovna uloga da spreči transport vlage. U kiseloj sredini, hitozan je pokazao dobre emulgjujuće sposobnosti za lipidnu frakciju filma, zahvaljujući elektrostatičkoj interakciji između pozitivno naelektrisanog hitozana i negativno naelektrisanih lipida pčelinjeg voska (Jumaa i Müller, 1999). Negativno naelektrisanje pčelinjeg voska potiče od karboksilnih grupa prisutnih u vosku. Pri uslovima emulgovanja sličnim kao u ovoj disertaciji, proizvedena je emulzija koja je bila stabilna više od 10 dana, što je dovoljno vreme za sušenje filma pri sobnim uslovima (potrebno je oko 7-8 dana) (Zhang *i sar.*, 2014). Većina prirodnih voskova: pčelinji, karnauba, kandelila imaju emulgjujuća svojstva, zahvaljujući sastavu koji obuhvata alkohole i estre dugačkih lanaca, tako da verovatno na granici faza dolazi do interakcije sa vodenom fazom i organizacije koja stabilizuje emulziju (Hernandez, 1994; Bosquez-Molina *i sar.*, 2003). Kombinacijom čvrstog i tečnog lipida u emulziji moguće je povećati stabilnost emulzije jer, pri upotrebi iste količine energije za formiranje emulzije, dobijaju se čestice manjeg dijametra i, nakon sušenja, filmovi manje debljine sa ravnomernijim pakovanjem lipidne frakcije u hidrokoloidnom matriksu (Bosquez-Molina *i sar.*, 2003). Postoje mnogi razlozi koji govore u prilog upotrebe voska u jestivim filmovima, među kojima su osnovni, sniženje propustljivosti vlage, niska propustljivost kiseonika i ugljendioksida, povećanje sjaja površine (Chen i Nussinovitch, 2001). Lipidi se često inkorporiraju u hidrokoloidne filmove da bi se poboljšala barijerna svojstva prema vlazi, ali u ovim filmovima dolazi do pogoršanja mehaničkih svojstava hidrokoloidnih filmova. Pčelinji vosak se u literaturi navodi kao odlična barijera za vodenu paru (Kristo *i sar.*, 2007; Yang i Paulson, 2000). Generalno, voskovi se navode kao najefikasnije supstance za snižavanje propustljivosti vodene pare. Njihova izražena hidrofobnost je posledica visokog sadržaja estara alkohola i kiselina dugačkih lanaca, kao i alkana sa velikim brojem C atoma. Takođe, čvrste masti se karakterišu gustom strukturom, koja ograničava transfer vode i u kojoj je rastvorljivost vode veoma niska (Debeaufort *i sar.*, 2000; Morillon *i sar.*, 2002). Za filmove sa dodatkom masnih kiselina je pokazano da propustljivost vodene pare opada sa porastom dužine lanca i stepena zasićenosti (Hagenmaier i Shaw, 1990; McHugh i Krochta, 1994; Bourtoom i Chinnan, 2009). Sa druge strane, samostalna upotreba lipidnih filmova je ograničena zbog nedostatka strukturnog integriteta i izdržljivosti (Kristo *i sar.*, 2007).

Na *Slici 44.* su prikazani svi analizirani filmovi i laminirani omotači. Dodatak EUK je uticao na izgled hitozanskog filma slično kao u prethodnim eksperimentima. Sa dodatkom rastuće koncentracije pčelinjeg voska, filmovi postaju sve više mat, neprozirni, žuti, meki, sa mirisom na vosak. Kod pojedinih filmova je došlo do nagomilavanja voska po obodu filma, što se na *Slici 44. (A)* zapaža kao tamnije žut obruč (d i e). Nagomilavanje voska po obodu filma je zapaženo i kod filmova na bazi proteina surutke sa pčelinjim voskom, u radu Pérez-Gago i Krochta (2001). Autori su ovaj fenomen objasnili tako što se prvo suše ivice filma, a

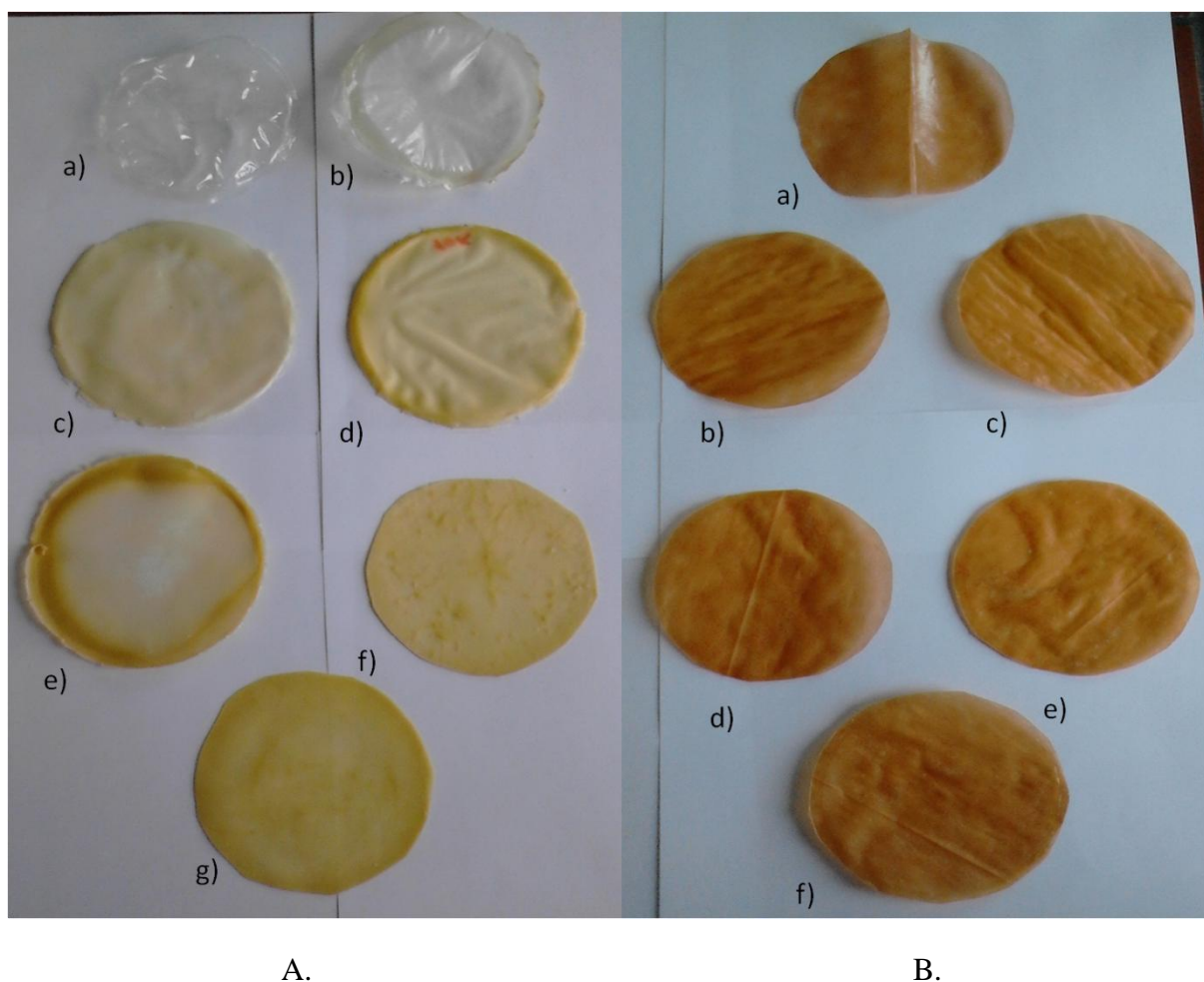


lipidna faza onda migrira ka hidrofobnijem delu filma, odnosno delu sa manjim sadržajem vlage. Pored ovoga, kod filmova sa najvećom koncentracijom voska zapaženi su nedostaci u vidu malih aglomerata voska i nejednakog obojenja filma (*Slika 44A. f i g*). Slični nedostaci su opisani u radu Marques (2012), koji se bavio analizom svojstava omotača na bazi hitozana i pčelinjeg voska. Ovi nedostaci su postali izraženi kada je u filmogenu emulziju dodata koncentracija voska od preko 10% u odnosu na hitozan (ili  $1 \text{ kg/m}^3$ ) i, najverovatnije, potiče od manje efikasnog emulgovanja. Nepravilnost oblika čestica u emulziji raste sa porastom koncentracije voska. Ovome doprinosi i činjenica da je pčelinji vosak čvrst na sobnoj temperaturi. Isparavanje rastvarača tokom sušenja filma dovodi do destabilizacije filmogene emulzije zbog pojave flokulacije i koalescencije emulgovanih kapi. Ovaj proces zavisi od koncentracije prisutnog lipida, početne veličine čestica emulgovane faze, viskoziteta kontinualne faze i svojstava dodirne površine kapi (Fabra *i sar.*, 2008). Što je niža tačka topljenja lipida, lakše je emulgovanje, i nastale emulgovane čestice su manje. Nastajanje kapi i njihov razvoj tokom procesa sušenja filma, odnosno sloja laminata dovodi do diskontinuiteta u polimernom matriksu, povećanja interne heterogenosti matriksa i do nepravilnosti na površini filma odnosno sloja laminata (Villalobos *i sar.*, 2005).

U ovoj disertaciji je pripremljen homogen film 5 puta veće koncentracije voska u odnosu na rad Marques (2012), najverovatnije zbog efikasnijeg procesa emulgovanja, usled prisustva EUK u emulziji, koja utiče na omekšavanje čestica voska i na sobnoj temperaturi, kao i zbog intenzivnijeg postupka mešanja (McClements, 1999; Bosquez-Molina *i sar.*, 2003). Pošto su, zbog izučavanja antimikrobnih i antioksidativnih svojstava, sintetisani i filmovi sa pčelinjim voskom, a bez dodatka EUK, poređenjem izgleda filmova sa i bez EUK uočeno je da filmovi sa EUK imaju homogeniji izgled i manje izražene nedostatke. U filmovima bez EUK bilo je moguće uočiti različito obojenje filmova (beličasto do žućkastog) usled neravnomerne inkorporacije voska, više izraženu migraciju voska prema obodu filma, kao i nedostatke u vidu aglomerata voska i zarobljenih mehurova u masi filma (Prilog 2).

Na *Slici 44. (B)* su prikazani nelaminirani i laminirani kolageni omotači. U odnosu na nelaminirani omotač, izgled površine laminiranog omotača je potpuno izmenjen, omotači su mat, meki, glatki, sa mirisom na vosak. Kako je sloj laminata značajno tanji od sloja biofilma, proces sušenja je višestruko brži. Boja kolagenog omotača je za nijansu svetlija (verovatno kao posledica žute boje biofilma) i mutnija, zamagljena (verovatno posledica mutnoće biofilma). Kada je u sloju laminata koncentracija voska dostigla  $36 \text{ kg/m}^3$  i više, na površini omotača su se mogli takođe zapaziti aglomerati voska, koji su estetski nepoželjni, jer deluju kao mana, nečistoća ili plesan, te mogu negativno uticati na senzorsku ocenu i prihvatljivost proizvoda. Ove nepravilnosti je najverovatnije, kao i kod biofilma moguće ukloniti optimizacijom postupka emulgovanja, postupka nanošenja emulzije na kolageni omotač, sušenjem na višim temperaturama (iznad tačke topljenja voska) ili upotrebom premaza sa manjom koncentracijom voska. Marques (2012) je pokazala da dodatkom pčelinjeg voska u hitozanski film dolazi do povećanja hidrofobnosti površine filma, pri čemu tamo gde se javljaju nepravilnosti u sloju voska, uočene u ovom radu kod filmova i laminiranih omotača sa većom koncentracijom voska (od  $36 \text{ kg/m}^3$  i više), ova hidrofobnost može i da opada. I kod biofilmova, kao i kod laminiranih omotača, sa dodatkom lipida, a posebno pčelinjeg voska

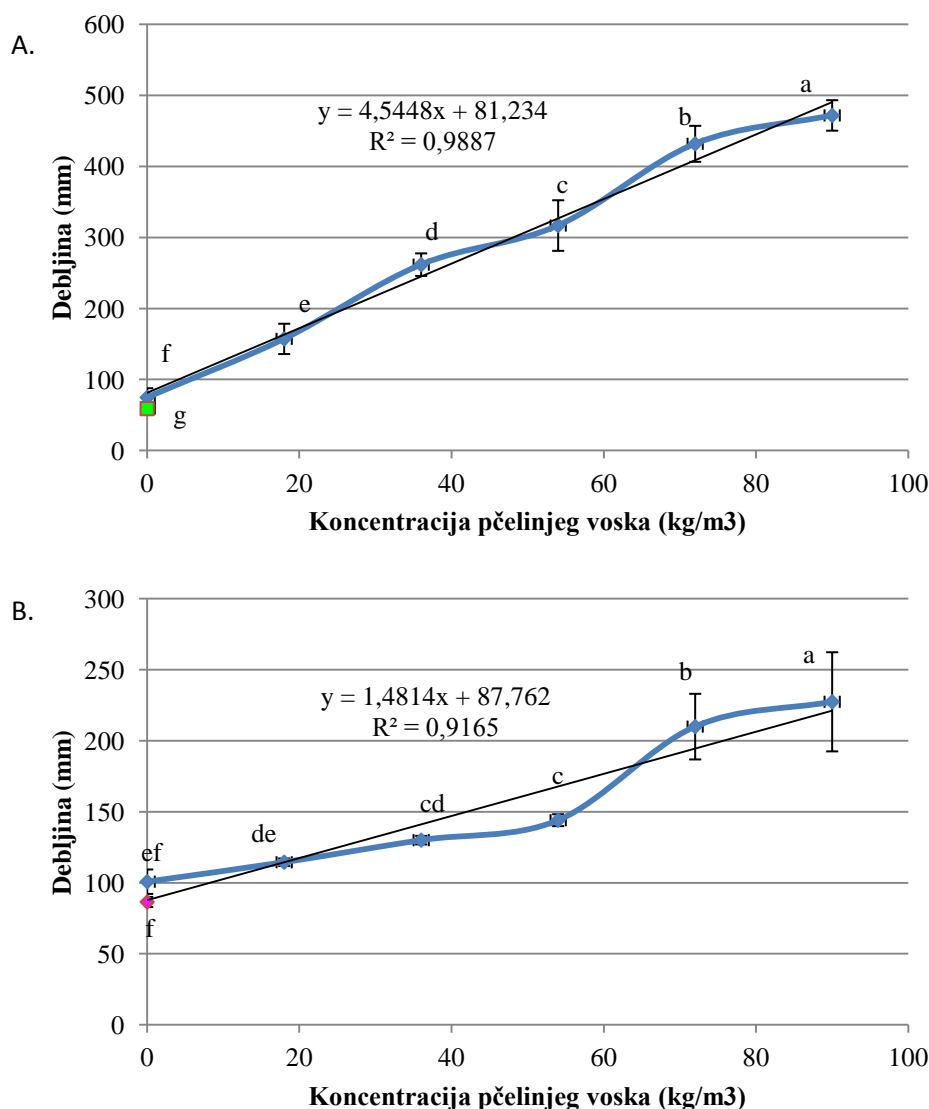
sjaj se gubi. Ovaj fenomen je zabeležen i u filmu na bazi Na kazeinata i pčelinjeg voska, a objašnjen je kao porast neravnosti površine filma sa dodatkom voska (Fabra *i sar.*, 2009).



Slika 44. Fotografije A. Biofilmova: a)hitozan; b)-g) hitozan, EUK i rastuća koncentracija pčelinjeg voska ( $\text{kg/m}^3$ ): 0, 18, 36, 54, 72, 90; B. Laminiranih kolagenih omotača: a)kolagen; b)-f) kolagen i laminat sa EUK i rastućom koncentracijom pčelinjeg voska ( $\text{kg/m}^3$ ): 0, 18, 36, 54, 72, 90.

### Fizičko-mehaničke karakteristike

Razlivanjem iste mase filmogenog rastvora na Petri ploče dobijene su različite vrednosti **debljina formiranih filmova**, u zavisnosti od koncentracije voska u filmu ( $p < 0.05$ ) (Grafik 23, A). Već je dodavanje EUK u hitozanski film dovelo do značajnog povećanja debljine ( $p < 0.05$ ) od oko 21%, što je slično rezultatu dobijenom u prethodnom eksperimentu sa EUK. Sa dodatkom voska, debljina filma linearno raste, kao što je prikazano na *Grafiku 23. (A)* ( $R^2 = 0.9887$ ). Sa dodatkom  $18 \text{ kg/m}^3$  voska, debljina filma je, sa početnih ( $74.91 \pm 13.00$ )  $\mu\text{m}$ , za film bez voska, porasla na više nego duplo veću vrednost od ( $157.31 \pm 21.33$ )  $\mu\text{m}$ . Daljim dodavanjem veće koncentracije voska u hitozanski biofilm debljina nastavlja da raste, da bi za film sa  $90 \text{ kg/m}^3$  voska, debljina filma iznosila čak ( $471.81 \pm 21.46$ )  $\mu\text{m}$ , što je 6 puta veća vrednost debljine u odnosu na film bez voska.



**Grafik 23.** Debljina ( $\mu\text{m}$ ), u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ), A. u biofilmu B. u laminiranom kolagenom omotaču (■ je čisto hitozanski biofilm, a ◆ je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

Slični rezultati su dobijeni i kod laminiranog kolagenog omotača. Debljina kolagenog omotača je bila ( $86.5 \pm 3.55$ )  $\mu\text{m}$ , a laminiranjem sa slojem filmogene emulzije sastavljene samo od hitozana i EUK došlo je do povećanja debljine omotača od oko 15%, do ( $100.78 \pm 8.60$ )  $\mu\text{m}$ . Ovo povećanje je slično rezultatima dobijenim u prethodnim eksperimentima sa EUO i EUK. Nanošenje filmogenog rastvora sa voskom, dovelo do porasta debljine ( $p < 0.05$ ) laminiranog omotača do ( $227.36 \pm 34.89$ )  $\mu\text{m}$ , za laminirani omotač sa  $90 \text{ kg}/\text{m}^3$  voska (Grafik 23, B). Ovaj porast debljine je takođe bilo moguće opisati linearnom funkcijom nešto nižeg koeficijenta korelacije ( $R^2 = 0.9165$ ).

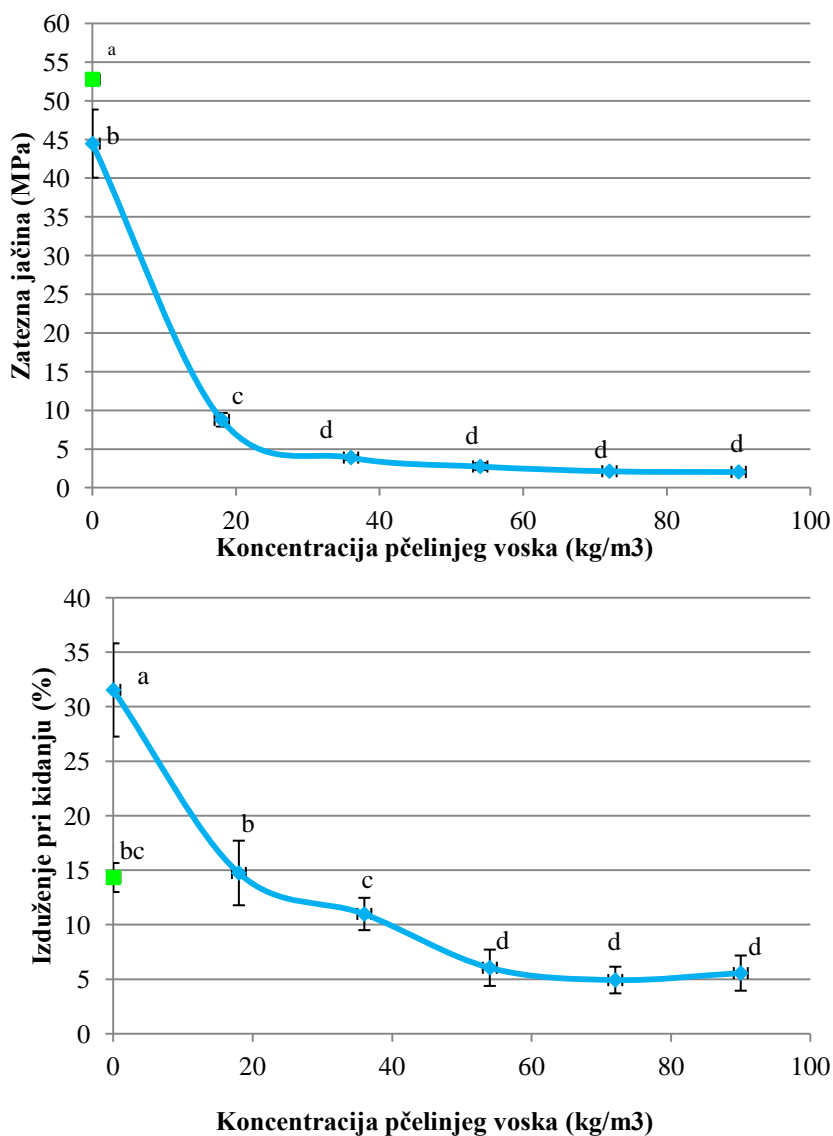
Slično dodatku etarskih ulja (opisano u prethodnim eksperimentima) i sa dodatkom voska je do izražaja došao efekat porasta debljine filma sa dodatkom rastvorene, odnosno emulgovane komponente usled čega slabi molekulska interakcija između polimernih lanaca i otvara se matriks filma (Bonilla *i sar.*, 2012). Iako je fenomen sličan kao sa dodatkom

etarskog ulja, kod dodatka pčelinjeg voska je intenzitet porasta značajno izraženiji. Kod filmova sa 0.8% EUO, debljina filma je povećana za oko 40% u odnosu na hitozanski film bez ulja, kod dodatka EUK nešto manje, dok je dodatak od  $18 \text{ kg/m}^3$  voska doveo do povećanja debljine od preko 100%, u odnosu na film bez voska. Ovde je došlo do sumiranja dva efekta, veća količina hidrofobne supstance u odnosu na polimer je dodata u hitozanski film, a, sa druge strane, efekat da dodatak voska, kao hidrofobnije komponente, u filmovima formiranim iz emulzija dovodi do izraženijeg povećanja debljine u odnosu na filmove sa dodatim uljima. Sa povećanjem koncentracije voska, veličina emulgovanih čestica još više raste, aglomerati se raspoređuju u matriksu filma razdvajajući makromolekulske lance i povećavajući debljinu (Han *i sar.*, 2006). Slični rezultati su dobijeni za film formiran iz emulzije metilceluloze i parafinskog ulja ili parafinskog voska (upotrebljena je ista masena koncentracija ulja i voska). Filmovi su formirani pomoću aplikatora za hromatografiju u tankom sloju podešenog na debljinu od  $100 \text{ }\mu\text{m}$ . Sam film na bazi metilceluloze je imao debljinu od  $(70 \pm 10) \text{ }\mu\text{m}$ , film sa dodatim parafinskim uljem  $(130 \pm 20) \text{ }\mu\text{m}$ , a sa dodatim parafinskim voskom  $(200 \pm 20) \text{ }\mu\text{m}$  (Martin-Polo *i sar.*, 1992). Film sa  $12 \text{ kg/m}^3$  voska u polisaharidnom filmu na bazi skroba je imao debljinu 70% veću od čisto polisaharidnog filma (Han *i sar.*, 2006). Slično, formirani film iz emulzije hitozana i pčelinjeg voska imao je veću vrednost debljine u odnosu na čisto hitozanski film (Velickova *i sar.*, 2015).

Kako je u eksperimentu sa EUK u hitozanskom filmu pokazano da mehanička svojstva laminiranog kolagenog omotača zavise prvenstveno od svojstava laminiranog sloja, to je na *Grafiku 24.* prikazana zatezna jačina i izduženje pri kidanju samo za hitozanski biofilm sa pčelinjim voskom. Sa *Grafika 24.* se može videti da je dodatak voska uticao značajno na promenu mehaničkih svojstava hitozanskog filma sa EUK. Došlo je do značajnog ( $p < 0.05$ ) umanjenja vrednosti oba parametra. Vrednost zatezne jačine za hitozanski film od  $(52.76 \pm 0.16) \text{ MPa}$ , kao i hitozanski film sa EUK od  $(44.47 \pm 4.40) \text{ MPa}$  je opala čak na  $(8.78 \pm 0.88) \text{ MPa}$  za film sa  $18 \text{ kg/m}^3$  voska, dok je za filmove sa većom koncentracijom voska vrednost zatezne jačine bila ispod  $4 \text{ MPa}$  ( $p > 0.05$ ). Zapaža se da nakon dodatka  $54 \text{ kg/m}^3$  voska nema dalje promene mehaničkih svojstava filmova ( $p > 0.05$ ). Kod zatezne jačine je ova granična vrednost, iza koje nema dalje promene, već na  $36 \text{ kg/m}^3$  voska, ali je  $54 \text{ kg/m}^3$  granica iza koje nema promene oba ispitivana mehanička svojstva.

Izduženje pri kidanju samog hitozanskog filma  $(14.32 \pm 1.33)\%$  je prvo bilo povećano dodatkom EUK na dvostruko veću vrednost od  $(31.53 \pm 4.28)\%$ , najverovatnije zahvaljujući plastifikujućem efektu ulja u strukturi filma, što je u saglasnosti sa nešto nižom vrednošću zatezne jačine (Chi, 2004; Fabra *i sar.*, 2008). U odnosu na prethodna dva eksperimenta, zapaža se da sada EUK deluje kao plastifikator, za razliku od rezultata prikazanim u ranijim eksperimentima. Ova promena se može dovesti u vezu sa većom koncentracijom hitozana u matriksu filma, pa je umesto smanjenja interakcije između polimera i gubitka kohezije i mehaničke otpornosti filma došlo do pravog efekta plastifikacije filma, gde je inkorporiranjem čestica ulja u matriks došlo do povećanja mobilnosti lanaca hitozana i povećanja elastičnosti filma. Veća koncentracija hitozana je mogla doprineti i formiranju stabilnije filmogene emulzije. Pored efekta veće koncentracije polimera, moguće je da je drugačiji postupak mešanja, kojim je veća količina energije uneta u filmogenu emulziju, doveo do formiranja finijih čestica emulgovane faze, što je, nakon sušenja, dovelo do ove promene u mehaničkim svojstvima hitozanskog filma sa EUK. Dodatkom pčelinjeg voska u

koncentraciji 18 kg/m<sup>3</sup> i 36 kg/m<sup>3</sup>, došlo je do sniženja vrednosti izduženja pri kidanju do vrednosti koje su slične kao za čisto hitozanski film. Kada su veće koncentracije voska od 54 kg/m<sup>3</sup>, 72 kg/m<sup>3</sup> i 90 kg/m<sup>3</sup> bile dodate u film, vrednost izduženja pri kidanju je bila niža nego kod čisto hitozanskog biofilma ( $p < 0.05$ ). Efekat je sličan kao sa dodatkom EUO i EUK u dva prethodna eksperimenta. Najverovatnije je da je razlog diskontinuitet u strukturi filma, jer lipidi nemaju mogućnost formiranja kontinualnog kohezivnog matriksa, kao i niži sadržaj vlage u filmu, pa samim tim i smanjenje elastičnosti filma jer voda deluje kao plastifikator (Rivero *i sar.*, 2010; Rubilar *i sar.*, 2013). Pored ovoga, priroda lipidne faze je da je ona čvrsta na sobnoj temperaturi i formira čvrstu (rigidnu) disperznu fazu koja smanjuje elastičnost filma (Marques, 2012).



**Grafik 24.** Zatezna jačina (MPa) i izduženje pri kidanju (%) u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska u biofilmu (kg/m<sup>3</sup>) (■ je čisto hitozanski biofilm). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

U radu Han *i sar.* (2006), u kojem su filmovi formirani iz emulzije skroba i pčelinjeg voska, zapažen je sličan efekat kao u ovom eksperimentu, gde je dodatkom voska u koncentraciji od preko 30% (w/w skroba) voska, što bi odgovaralo vrednosti od  $9 \text{ kg/m}^3$ , došlo do smanjenja vrednosti zatezne jačine i izduženja pri kidanju. Za manje koncentracije voska, nije zapažena značajna promena ovih parametara. Slični rezultati su prikazani u radu Marques (2012), u analizi svojstava omotača na bazi hitozana sa dodatkom pčelinjeg voska, gde tek dodatkom veće koncentracije voska u hitozanski film od 10%, što bi odgovaralo koncentraciji od  $1 \text{ kg/m}^3$  dolazi do promene parametara mehaničkih svojstava filmova, i to do smanjenja vrednosti zatezne jačine i izduženja pri kidanju (Marques, 2012). U radovima Min *i sar.* (2009), Pérez-Gago i Krochta (2001) i Shellhammer i Krochta (1997), koji su se bavili analizom promena mehaničkih svojstava filmova formiranih iz emulzije proteina surutke i pčelinjeg voska, u zavisnosti od različitih faktora, pokazano je da niže koncentracije voska, do oko 40% (što odgovara koncentraciji voska od  $40 \text{ kg/m}^3$ ) ne dovode do promene mehaničkih svojstava biofilma, ili dovode do efekta plastifikacije filma, dok više koncentracije dovode do snižavanja, kako zatezne jačine, tako i izduženja pri kidanju proizvedenog biofilma. Kada su autori razmatrali uticaj postupka mešanja, odnosno veličine čestica pčelinjeg voska u nastaloj emulziji, zaključeno je da za niže koncentracije emulgovane faze, postupak mešanja nema uticaja, dok su za više koncentracije voska, koje bi odgovarale koncentracijama korišćenim u ovoj disertaciji, intenzivnije mešanje i manji prečnici čestica u emulziji, doveli do povećanja vrednosti izduženja pri kidanju i zatezne jačine, zahvaljujući imobilizaciji polimera na površini čestica voska. Sličan efekat dodatka pčelinjeg voska kao u ovoj disertaciji, dobijen je za film na bazi natrijum kazeinata i kazeina gde je došlo do slabljenja filma, što su autori objasnili kao posledicu čvrstog stanja pčelinjeg voska na sobnoj temperaturi (Fabra *i sar.*, 2009).

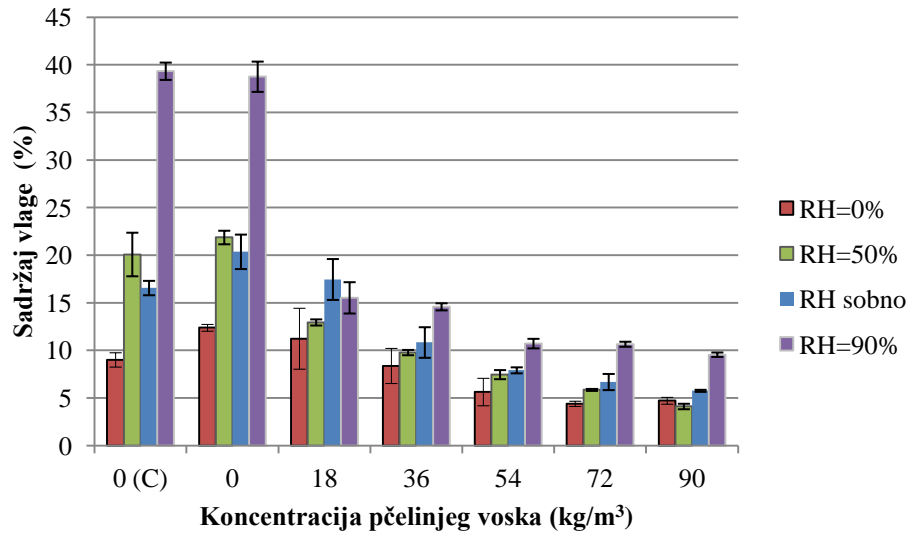
### Fizičko-hemijske karakteristike

Na *Grafiku 25.* su prikazani rezultati ispitivanja fizičko-hemijskih karakteristika biofilmova. Zbog čitljivosti i preglednosti grafika, značajnost razlika srednjih vrednosti je prikazana u tabelama ispod grafika tamo gde je više faktora ispitivano (*Grafik 25.*, a i b). Ispitivana fizičko-hemijska svojstva se odnose na dejstvo vlage na biofilme. Kako je osetljivost ispitivanih biofilmova i sloja laminata na dejstvo vlage daleko izraženija od osetljivosti kolagenog filma, to se i osetljivost laminiranih filmova na dejstvo vlage može opisati predstavljenim svojstvima biofilmova. Na *Grafiku 25. (a)* je prikazan **sadržaj vlage** u filmovima pri četiri različite relativne vlažnosti vazduha: 0%, 50%, sobna i 90%. Očekivano je za sve filmove najveći sadržaj vlage određen pri najvišoj relativnoj vlažnosti vazduha od 90%, a najniži pri RH 0%. Pri niskoj vlažnosti vazduha, fizičko vezivanje vode za aktivna mesta u polimeru se odvija samo na površini filma, gde dolazi do vezivanja za hidroksilne grupe u polimeru. Na ovaj način dolazi do lokalnog rastvaranja hidroksilnih grupa i bubrenja polimera, čime se nove grupe oslobađaju kao aktivna mesta za vezivanje (Bertuzzi *i sar.*, 2007; Quek *i sar.*, 2007; Ludwiczak i Mucha, 2010). Pri srednjim vrednostima vlažnosti vazduha, adsorpcija vlage se odvija i na slabije dostupnim mestima, usled čega dolazi do efekta plastifikacije polimera (Felade i Aworh, 2004; Marques, 2012). Usled efekta plastifikacije i otkrivanja većeg broja aktivnih mesta, naglo se povećava apsorpcija vlage u

polimernom filmu, pa može doći i do raskidanja strukture polimera. Međutim, sa dodatkom voska u film, ove razlike se smanjuju, pa se sadržaj vlage u uslovima različite relativne vlažnosti izjednačava, pre svega 0%, 50% i sobna RH, dok sadržaj vlage pri 90% ostaje nešto viši. Sa porastom koncentracije voska u filmu, opada sadržaj vlage pri svim RH vrednostima. Pri svim RH, osim 90%, sadržaj vlage opada približno linearno sa povećanjem koncentracije voska u filmu. Pri RH 90% dolazi do naglog opadanja vrednosti sadržaja vlage sa dodatkom manje koncentracije voska u film, a sa povećanjem koncentracije voska, sadržaj vlage se ustaljuje. Slični rezultati su prikazani kao posledica dodatka pčelinjeg voska u hitozanski biofilm u radu Marques (2012), a objašnjeni su kao posledica interakcije voska i hitozana gde, usled rasporeda hidrofobnih čestica u polimeru matriksa preostaje mali broj aktivnih mesta za apsorpciju vode. Kao i u prethodnim eksperimentima, nema razlike ( $p > 0.05$ ) u sadržaju vlage između biofilma sa i bez EUK, bez obzira na primenjene drugačije uslove mešanja pri formiranju filmogene emulzije.

Na *Grafiku 25. (b)* je prikazana zavisnost **spособnosti bubrenja biofilmova** pri različitim vrednostima pH, u zavisnosti od dodatka EUK i rastuće koncentracije pčelinjeg voska. Najveća sposobnost bubrenja je dobijena u dejonizovanoj vodi, a najmanja u puferu pH 9. Ovakva zavisnost je očekivana zbog disocijacije aktivnih grupa polimera pri pH nižoj od 6.5. Razlike u sposobnosti bubrenja, u zavisnosti od vrednosti pH, su najizraženije za hitozanski film bez lipidne komponente, dok sa dodatkom EUK, a posebno sa dodatkom pčelinjeg voska, vrednosti za sposobnost bubrenja u različitim puferima se izjednačuju. Najverovatnije je ovo posledica interakcije EUK i pčelinjeg voska i hitozana, usled čega je broj slobodnih aktivnih grupa sve manji, a sposobnost bubrenja se sve više bazira na difuziji molekula vode (Mathew *i sar.*, 2006; Peng i Li, 2014). Sa dodatkom EUK, sposobnost bubrenja opada za oko 65% u odnosu na hitozanski film, slično kao i u prethodnim eksperimentima sa EUO i EUK. Sa dodatkom voska u film, sposobnost bubrenja u odnosu na film sa EUK opada linearno, a u odnosu na hitozanski film bez EUK eksponencijalno.

Rastvaranje hitozana se nadovezuje na process bubrenja. U vodi film intenzivno bubri i postepeno prelazi u rastvor. **Rastvorljivost** je posledica protonizacije  $-NH_2$  grupe na C(2) poziciji D-glukozamin jedinice, gde polisaharid u kiseloj sredini prelazi u polielektrolit. Slično kao kod bubrenja, dodatkom pčelinjeg voska došlo je do sniženja rastvorljivosti hitozanskog filma, osim što je smanjenje rastvorljivosti sa dodatkom voska u film manje izraženo u odnosu na sposobnost bubrenja (*Grafik 25, c*). Statistički značajno različite vrednosti u odnosu na hitozanski film bez EUK su zapažene za filmove sa  $72 \text{ kg/m}^3$  i  $90 \text{ kg/m}^3$  voska, a u odnosu na film sa EUK, za filmove sa koncentracijom voska od  $36 \text{ kg/m}^3$  do  $90 \text{ kg/m}^3$  ( $p < 0.05$ ). Kao i u prethodnim eksperimentima, dodatkom EUK u hitozanski biofilm došlo je do numeričkog porasta srednje vrednosti rastvorljivosti, ali ova promena nije statistički značajna ( $p < 0.05$ ).

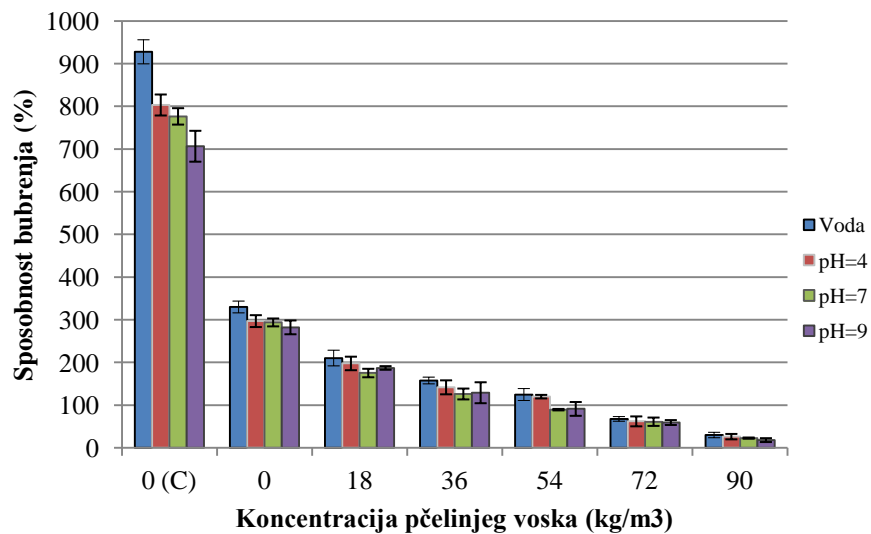


a)

Tabela 15. Značajnost razlika srednjih vrednosti na Grafiku 3. (a)

	0(C)	0	18	36	54	72	90
RH=0%	abcC	aC	abB	bcdC	cdB	cdC	dD
RH=50%	aB	aB	bAB	cBC	cdB	deBC	eC
RHsobno	bB	aB	abA	cB	cdB	dB	dB
RH=90%	aA	bA	cA	dA	eA	eA	eA

Mala slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite srednje vrednosti u redu, a velika slova A, B, C, D u koloni



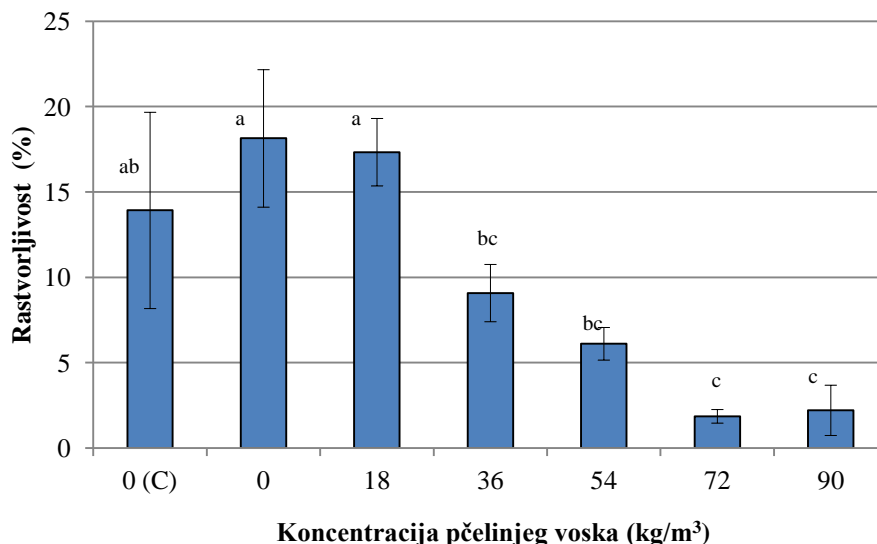
b)

Tabela 16. Značajnost razlika srednjih vrednosti na Grafiku 3. (b)

	0(C)	0	18	36	54	72	90
Voda	aA	bA	cA	dA	dA	eA	eA
pH=4	aB	bAB	cAB	dA	dA	eA	eA
pH=7	aBC	bB	cAB	dA	eB	eA	fA
pH=9	aC	bB	cB	dA	deB	efA	fA

Mala slova a, b, c, d, e, f označavaju statistički značajno različite srednje vrednosti u redu, a velika slova A, B, C u koloni



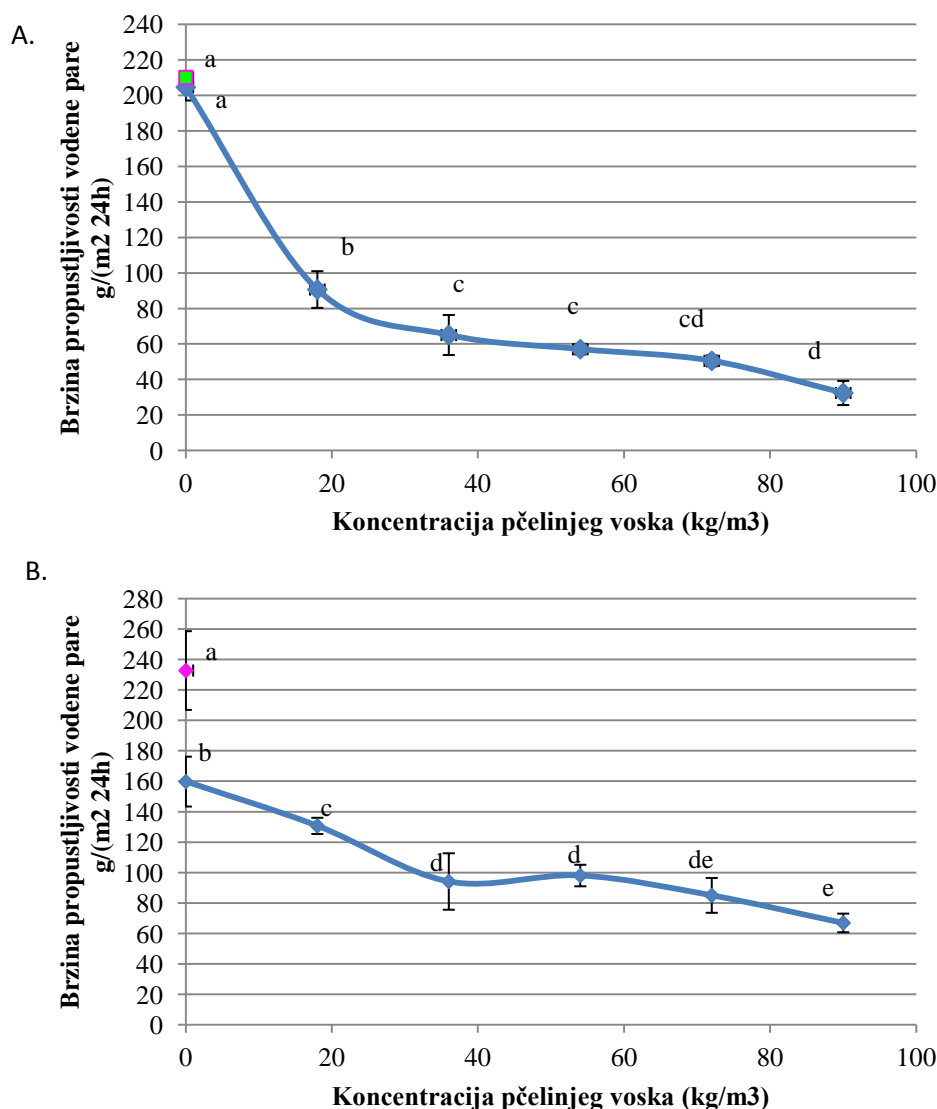


c)

**Grafik 25.** Fizičko-hemijske karakteristike biofilma u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska (kg/m<sup>3</sup>) (0 (C) je čisto hitozanski biofilm): a) Sadržaj vlage (%); b) Sposobnost bubrenja (%); c) Rastvorljivost (%). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d, e, f, A, B, C, D označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

### Barijerna svojstva

Rezultati za **brzinu propustljivosti vodene pare** kroz ispitivane biofilmove i laminirane kolagene omotače dati su na *Grafiku 26*. Ukoliko se upoređi hitozanski biofilm sa i bez EUK, slično kao i u prethodnim eksperimentima, nema značajne razlike u propustljivosti vodene pare ( $p < 0.05$ ), tako da na ovo svojstvo intenzivniji uslovi mešanja nisu imali efekta. Najverovatnije da količina i hidrofobnost EUK nisu dovoljni da bi došlo do smanjenja propustljivosti vodene pare. Kada je u pitanju laminirani kolageni omotač, efekat dodatka EUK je takođe sličan rezultatima prikazanim u prethodnim eksperimentima i sloj laminata sa EUK je doveo do smanjenja propustljivosti kolagenog omotača za vodenu paru ( $p < 0.05$ ). Najverovatnije je došlo do određene interakcije na graničnoj površini laminacije i kao rezultat toga je, kao i u prethodnom eksperimentu, došlo do smanjenja brzine propustljivosti vodene pare. Dodatak hidrofobne supstance u film ne garantuje smanjenje brzine propustljivosti vodene pare jer propustljivost ne zavisi samo od sternih smetnji i zadržavanja molekula vode u matriksu filma što dovodi do smanjenja koeficijenta difuzije, već i od postojanja pora, šupljina, pukotina i kanala koji olakšavaju transport (Cheng *i sar.*, 2008). Balans između ova dva efekta određuje postizanje snižavanja propustljivosti vodene pare. Kada je u film, odnosno sloj laminata, dodat pčelinji vosak, došlo je do sniženja brzine propustljivosti vodene pare i to za koncentracije voska od 18 kg/m<sup>3</sup> i 36 kg/m<sup>3</sup>, nakon čega sa povećanjem koncentracije voska dolazi do stagnacije i novi pad ( $p < 0.05$ ) je uočen za koncentraciju voska 90 kg/m<sup>3</sup>. Slični rezultati su dobijeni u radu Marques (2012) i Velickova *i sar.* (2013).



**Grafik 26. Brzina propustljivosti vodene pare (g/m<sup>2</sup> 24h): A. biofilma; B. laminiranog kolagenog omotača u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska (kg/m<sup>3</sup>) (■ je hitozanski biofilm bez EUK i voska, a ◆ je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite vrednosti (p<0.05).**

Na bazi velikog broja literaturnih podataka, mogu se sagledati osnovni faktori koji utiču na propustljivost za vodenu paru kod filmova dobijenih iz emulzije hidrokoloidea i lipida. Neki od ovih faktora su: karakteristike i koncentracija hidrokoloidea, vrsta i koncentracija lipida, uslovi formiranja emulzije i stabilnost emulzije tokom sušenja filma, debljina filma, orijentacija filma, kompatibilnost faza i uticaj lipidne frakcije na mikrostrukturu filma. Lipidi u čvrstom stanju nisu univerzalno najbolji aditivi za sniženje propustljivosti vlage kroz hidrokoloidea film, već će efekat dodatka lipida u film zavisiti od kompatibilnosti faza i uticaja lipidne frakcije na mikrostrukturu filma. Tako dodatak kakao maslaca u film na bazi skroba i metilceluloze nije doveo do poboljšanja barijernih svojstava za vlagu zbog narušavanja mikrostrukture filma, za razliku od dodatka ulja soje (Bravin *i sar.*, 2004). U radu Han *i sar.* (2006), koji je analizirao dodatak pčelinjeg voska (3 kg/m<sup>3</sup>, 6 kg/m<sup>3</sup>, 9 kg/m<sup>3</sup> i 12 kg/m<sup>3</sup>) u 3% (w/w) film na bazi skroba ustanovljeno je smanjenje propustljivosti vodene pare kroz film koje je bivalo izraženije sa povećanjem koncentracije voska, ali je ukupno

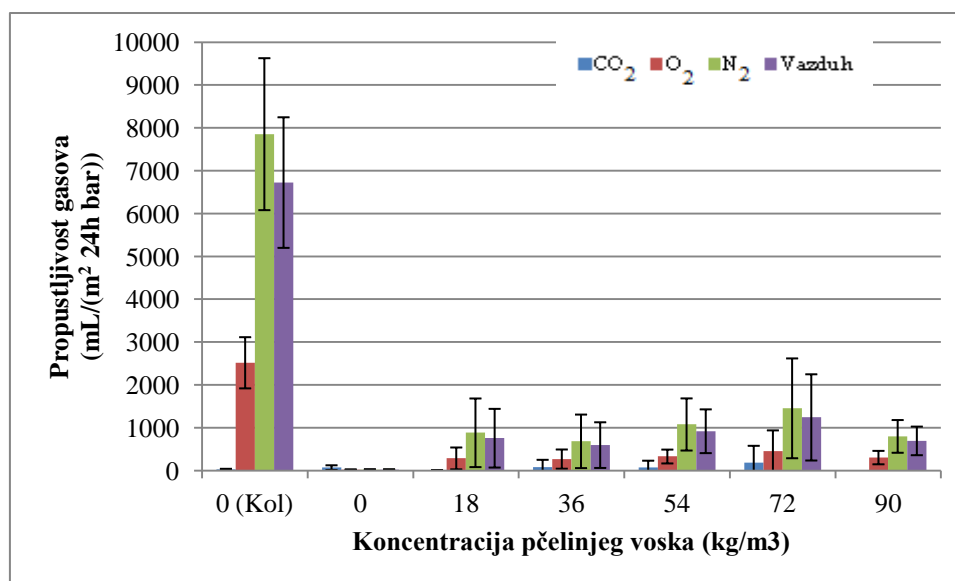
smanjenje daleko niže od očekivanog. Autori su pretpostavili da je koncentracija voska u filmu niska, te kroz značajan deo skrobnog matriksa bez voska vodena para nalazi put. U radu Navaro-Torazaga *i sar.* (2011), rastuća koncentracija pčelinjeg voska je, u filmu na bazi hidroksipropilmetilceluloze, dovela do postupnog smanjenja propustljivosti vodene pare, promene koja je sličnija trendu promene zapažene za laminirani omotač u ovoj disertaciji u odnosu na biofilm, gde je promena značajno oštrija. Navaro-Torazaga *i sar.* (2011) su, takođe, razmatrali uticaj razdvajanja faza emulzije tokom sušenja filma i zaključeno je da je, usled potpunog razdvajanja faza dolazi do značajnog sniženja propustljivosti i do formiranja dvoslojnog filma, gde je propustljivost vodene pare ostala nepromenjena nakon promene orijentacije filma. Sa druge strane, nepotpuno razdvajanje faza u filmu na bazi kazeina sa dodatkom različitih voskova (kandelila i karnauba) je dovelo do ograničenog snižavanja propustljivosti vodene pare čija je vrednost bliža vrednosti propustljivosti polimernog filma nego čistog voska. Takođe, delimično razdvajanje faza je dovelo do različitih vrednosti za propustljivost vodene pare kod filmova na bazi proteina surutke i pčelinjeg voska, u zavisnosti od orijentacije filma, kao i kod filmova na bazi hidroksipropilmetilceluloze sa dodatkom velike koncentracije masnih kiselina. Iako je sa povećanjem koncentracije voska, kao i sa dodatkom masnih kiselina, u filmu došlo do smanjenja propustljivosti filma za vodenu paru, kada je zona bogata lipidnom frakcijom bila okrenuta ka zoni više vlažnosti vazduha, dobijene su niže vrednosti za propustljivost pri svim koncentracijama pčelinjeg voska i svim testiranim masnim kiselinama u filmu (Hagenmaier i Shaw, 1990; Pérez-Gago i Krochta, 1999). Pritom, različiti voskovi u istoj koncentraciji su doveli do različitog snižavanja propustljivosti za vodenu paru, pri čemu je tvrđi karnauba vosak pokazao slabiji efekat, najverovatnije zbog teže inkorporacije i narušavanja kontinuiteta filma nakon sušenja (Chick i Hernandez, 2002). U radu Shellhammer i Krochta (1997), kada je opseg koncentracije voskova: pčelinjeg, kandelila i karnauba sličan koncentracijama korišćenim u ovoj tezi dodat u film na bazi proteina surutke, došlo je do značajnog sniženja vrednosti za propustljivost vodene pare. Maksimalna koncentracija pčelinjeg voska, koju je bilo moguće inkorporirati u filmogenu emulziju, da se dobije film, je bila daleko viša od preostala dva analizirana voska. Najniže vrednosti za propustljivost vodene pare dobijene su za film sa dodatkom pčelinjeg voska, a najveći pad vrednosti je ustanovljen oko 35% dodatog voska, a preko 40% dodatog voska, vrednosti za propustljivost nisu dalje opadale. Propustljivosti 100% lipidnih filmova bile su uporedive sa komercijalnim polimernim materijalima, i to: film od karnauba i pčelinjeg voska je imao propustljivost u nivou PET-a, od kandelila voskom u nivou LDPE-a i PVDC-a. Dodatkom hidrokoloida u lipidni film, vrednosti za propustljivost vodene pare se povećavaju i udaljuju od ovih vrednosti za navedene komercijalne polimerne materijale. Perez-Gago i Krochta (2001), Min *i sar.* (2008), McHugh i Krochta (1994) su pokazali da smanjenje srednjeg prečnika čestica od 2.0  $\mu\text{m}$  do 0.8  $\mu\text{m}$  je bilo u korelaciji sa smanjenjem propustljivosti vodene pare kroz film formiran iz emulzije proteina surutke i pčelinjeg voska. Kritična vrednost veličine čestica pčelinjeg voska ispod koje nije došlo do razdvajanja faza je bila 1.5  $\mu\text{m}$ , koja je postignuta uslovima mešanja sličnim kao u ovoj disertaciji, dok je za manje srednje prečnike čestica voska bilo neophodno primeniti oštrije uslove mešanja, tj emulgovanje pod visokim pritiskom. Ova korelacija se odnosi samo na filmove iz emulzije sa visokom koncentracijom voska, jer su to formulacije u kojima dolazi do izražaja povećanje imobilizacije proteinskih lanaca na velikoj površini lipidnih čestica,

koje dovodi do uređenije tesno umrežene strukture. Takođe, povišena temperatura pri sušenju filma dovela je do smanjenja propustljivosti vodene pare. Pretpostavka je da je uspostavljen bolji raspored i jača kohezija u polimernom matriksu, kao i da je temperatura sušenja koja je iznad tačke topljenja voska može dovesti do promene morfologije kristala voska i/ili rasporeda lipida u matriksu.

U radu Zhang *i sar.* (2014) koji je analizirao uticaj premaza na bazi hitozana i pčelinjeg voska na propustljivost vodene pare kroz papir, uočen je uticaj više različitih faktora na ovo svojstvo, pri čemu je najizraženiji uticaj koncentracije pčelinjeg voska u matriksu hitozana, a zatim slede približno jednaki uticaji koncentracije hitozana i temperature sušenja premaza. Sa povećanjem koncentracije pčelinjeg voska u premazu, došlo je do smanjenja propustljivosti vodene pare, ali ovo povećanje koncentracije nije moglo biti neograničeno, jer je pri koncentraciji od 97% voska u odnosu na suhu materiju filmogene emulzije došlo do narušavanja strukture hitozanskog matriksa i do povećanja propustljivosti. Takođe, više koncentracije hitozana su rezultirale nižim vrednostima propustljivosti, ali pri koncentraciji hitozana iznad 1.2% bilo je teško izvršiti laminiranje papira. Velickova *i sar.* (2013)<sup>a</sup> su pokazali smanjenje propustljivosti vodene pare od 2.5 puta u kompozitnom filmu na bazi hitozana 1% (w/v) uz dodatak 100 kg/m<sup>3</sup> pčelinjeg voska, u odnosu na hitozanski biofilm. Jedino je hitozanski film laminiran obostrano alkoholnim rastvorom voska pokazao nešto nižu vrednost propustljivosti vodene pare. U studiji Martin-Polo *i sar.* (1992) o uticaju različitih faktora na brzinu propustljivosti vodene pare kroz film na bazi emulzije metilceluloze i parafinskog ulja ili parafinskog voska, zapaženo je da neravnost podloge utiče na povećanje propustljivosti vodene pare, emulgovanje parafinskog voska i ulja je dovelo do smanjenja propustljivosti vodene pare metilceluloznog filma od oko 30%, dok je laminacija slojem otopljenog parafinskog voska dovela do daleko značajnijeg pada propustljivosti od 98%, što je dovedeno u vezu sa pravilnijim raspoređivanjem hidrofobne supstance na graničnoj površini. Slični rezultati su prikazani i za film na bazi kazeina i zeina sa dodatkom parafinskog voska (Sohail *i sar.*, 2006). Lipidi u čvrstom stanju su pokazali bolja barijerna svojstva za vlagu u odnosu na lipide koji su na sobnoj temperaturi u tečnom stanju. Ipak, radi poboljšanja pokrovne moći voskova, može se u vosak dodati do 25% tečnog lipida, a da se propustljivost sloja ne promeni (Martin-Polo *i sar.*, 1992<sup>a</sup>). Dodatkom tečnog lipida (mineralnog ulja, oleinske kiseline i meki pčelinji vosak) u karnauba vosak poboljšana su barijerna svojstva filma na bazi emulzije voska i hidrokoloida (Molina *i sar.*, 2003).

Na *Grafiku 27.* je predstavljena **propustljivost ispitivanih laminiranih omotača za gasove**, ugljendioksid, kiseonik, azot i vazduh. Obzirom na mehanička svojstva ispitivanih biofilmova, nije bilo moguće izvršiti analizu propustljivosti gasova, primenom navedene metode, već su rezultati prikazani samo za laminirane omotače. Propustljivost samog kolagenog omotača za gasove je izrazito visoka, što je u skladu sa ulogom koju ovaj omotač ima u sušenju i dimljenju kobasice. Laminiranjem slojem sa hitozanom i EUK došlo je do sniženja propustljivosti za sve gasove osim ugljendioksida, i to sa srednje vrednosti propustljivosti za O<sub>2</sub> 2518.8 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) na 21.5 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar), sa srednje vrednosti propustljivosti N<sub>2</sub> 7856.2 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) na 19.96 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) i sa srednje vrednosti propustljivosti vazduha 6726.1 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) na 20.3 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar). Rezultati za omotač laminiran slojem hitozan-EUK je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u prethodnim eksperimentima sa EUO i EUK, što znači da veća koncentracija hitozana i intenzivnije

mešanje u pripremi filmogene emulzije u ovom eksperimentu nisu imali uticaja na barijerna svojstva ispitivanih omotača za gasove. Dodatkom pčelinjeg voska u filmogenu emulziju, došlo je do povećanja propustljivosti za kiseonik i azot laminiranih kolagenih omotača, ali u uslovima eksperimenta ova promena nije bila statistički značajna. Srednje vrednosti propustljivosti za O<sub>2</sub> su se kretale od 270.0 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) do 456.0 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar), za N<sub>2</sub> od 684.6 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) do 1455.3 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) a za vazduh od 596.8 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar) do 1243.8 mL/(m<sup>2</sup> 24h bar). Iako statistički nije bilo značajne razlike (p>0.05) između propustljivosti omotača sa slojem hitozan-EUK i sa slojem hitozan-EUK-vosak, praktično su razlike u vrednostima propustljivosti kiseonika i azota značajne. Između omotača sa različitom koncentracijom voska nije bilo razlike u propustljivosti za gasove. Varijacije vrednosti propustljivosti omotača za gasove su bile izuzetno visoke, što govori o neujednačenosti sloja laminata od kojeg ovo barijerno svojstvo zavisi. Ova neujednačenost je najverovatnije posledica postupka nanošenja, promena u emulziji tokom sušenja, kao i neravnosti podloge koju čini kolageni omotač. U radu Chen i Nussinovitch (2001), analizom propustljivosti kiseonika za premaze na bazi emulzije različitih hidrokoloida (0.5% w/w): ksantan, guar, guma iz rogača i lipidne frakcije sastavljene od 100 kg/m<sup>3</sup> karnauba voska, 20 kg/m<sup>3</sup> šelak smole, 18 kg/m<sup>3</sup> oleinske kiseline i 24 kg/m<sup>3</sup> morfolina nanosene na LDPE, dobijene su vrednosti ispod 100cm<sup>3</sup> μm/(m<sup>2</sup> d KPa), pri čemu su premazi imali debljinu oko 5.3 μm. Slične vrednosti su dobijene i za čisto lipidni premaz. Potpuno drugačiji rezultati su prikazani u radovima Ayranci i Tunc (2003), Han *i sar.* (2006), gde dodatkom lipidne frakcije u film na bazi hidrokoloida dolazi do povećanja propustljivosti filma za kiseonik. Pretpostavka je da je to zbog pojave diskontinuiteta u matriksu hidrokoloidnog filma što dovodi do pojave otvorenih prolaza za molekule kiseonika, kao i zbog lošije barijere lipida za gasove. Do promene propustljivosti kazeinskog filma sa dodatkom karnauba voska nije došlo čak ni sa povećanjem koncentracije ovog voska u filmu, najverovatnije zbog pojave razdvajanja faza u filmu, gde je donji deo filma sastavljen pretežno od proteina i zahvaljujući tome je niska propustljivost za kiseonik sačuvana (Chick i Hernandez, 2002). Dodatkom pčelinjeg voska u film na bazi hidroksipropilmetilceluloze (Navarro-Tarazaga *i sar.*, 2011), došlo je do povećanja propustljivosti filma za kiseonik, ali povećanjem koncentracije voska u filmu nije došlo do dalje promene ovog barijernog svojstva. Ovi rezultati su u uporedivi sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. U navedenom radu se pretpostavlja da su ovi rezultati posledica delimičnog razdvajanja faza, te da postoji sloj bogatiji voskom na vrhu i sloj u kojem osnovu čini hidroksipropilmetilceluloza i da je ovo razlog zašto sa povećanjem koncentracije voska u filmu, nije došlo do daljeg opadanja barijernih svojstava filma za kiseonik. Sa dodatkom kandelila ili karnauba voska u film na bazi kazeina (Chick i Hernandez, 2002) nije došlo do promene propustljivosti filma za kiseonik, za koncentraciju voska 5%-15% u odnosu na kazein. Na SEM slikama je uočeno da iako ima defekata i pukotina u gornjem sloju filma koji je bogatiji voskom, donji deo je pretežno sastavljen od kazeina koji predstavlja barijeru za gasove. Autori pretpostavljaju da je došlo do razdvajanja komponenata filma na proteinski i voštani sloj, bar pri dnu filma, gde se izdvojio proteinski sloj, jer da do razdvajanja slojeva nije došlo, bilo bi očekivano da se propustljivost filma za kiseonik poveća.



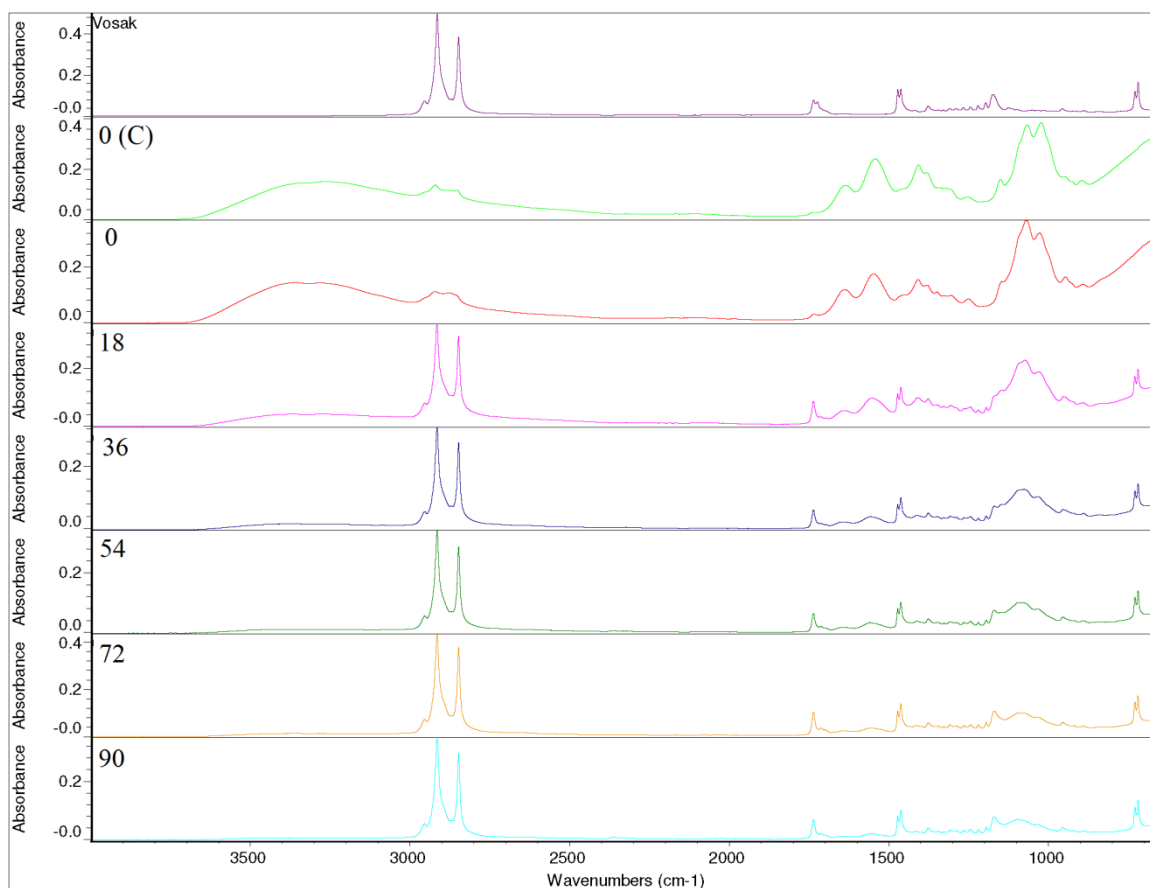
**Grafik 27. Propustljivost gasova (mL/(m<sup>2</sup> 24h bar)) kod laminiranih kolagenih omotača u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska (kg/m<sup>3</sup>) (0 (Kol) je nelaminirani kolageni omotač). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju.**

U radu Han *i sar.* (2006) gde je u film na bazi skroba dodavan pčelinji vosak u rastućoj koncentraciji (3 kg/m<sup>3</sup>, 6 kg/m<sup>3</sup>, 9 kg/m<sup>3</sup> i 12 kg/m<sup>3</sup>), dodatak voska do 9 kg/m<sup>3</sup> nije uticao značajno na propustljivost kiseonika, a sa dodatkom 12 kg/m<sup>3</sup> je došlo do značajnog povećanja propustljivosti filma za kiseonik. Kako se mehanizam propuštanja gasa sastoji od difuzije i apsorpcije, autori su ponudili dve hipoteze za objašnjenje rezultata. Prva hipoteza se tiče difuzije kiseonika kroz hidrofobne kanale u pčelinjem vosku. Kiseonik može difundovati kroz penetracione kanale formirane na graničnoj površini vosak-skrob. Sa povećanjem ove granične površine, odnosno sa povećanjem koncentracije voska u filmu, povećava se i broj kanala kroz koji kiseonik može difundovati, pa se povećava i propustljivost filma za kiseonik. Prema drugoj hipotezi, koja se tiče apsorpcije, povećana koncentracija voska u filmu vodi povećanoj koncentraciji voska u površinskom sloju filma, tj. snižava površinsku energiju filma sa povećanjem hidrofobnosti. Ovaj fenomen može ubrzati apsorpciju kiseonika iz atmosfere i povećati rastvorljivost kiseonika. Kako se propustljivost sastoji iz oba fenomena, difuzivnosti i rastvorljivosti, značajno povećanje rastvorljivosti će dovesti do povećanja propustljivosti filma za kiseonik.

Na osnovu prikazanih rezultata ispitivanja i navedenih literaturnih citata, može se zaključiti da je dodatkom voska u biofilm na bazi hitozana došlo do povećanja propustljivosti filma za gasove zbog visokih koncentracija dodatog voska i stabilnosti formirane filmogene emulzije koja je ostala stabilna tokom postupka sušenja filma. Kada je kritična koncentracija voska dodata u film, daljim povećanjem koncentracije voska u filmu nije došlo do promene propustljivosti. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za brzinu propustljivosti vodene pare.

## Određivanje strukture ATR-FTIR spektrofotometrijom

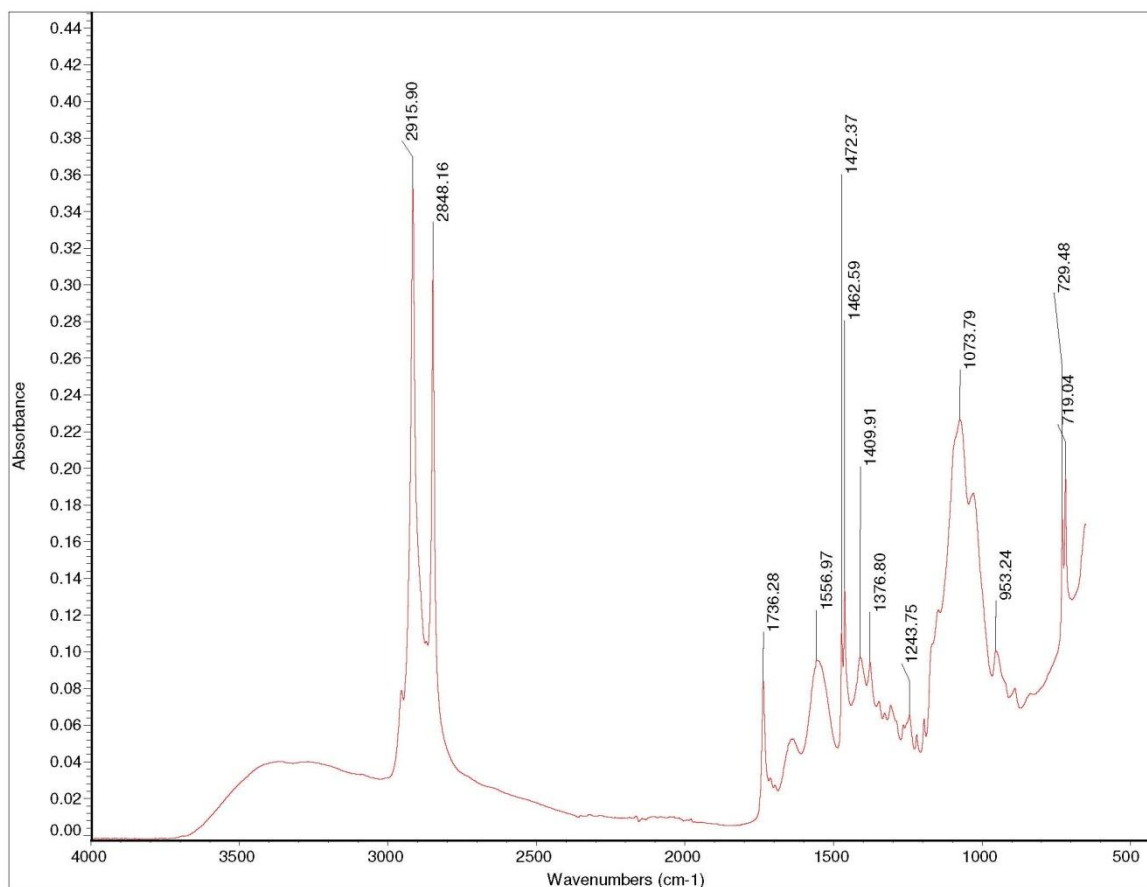
Na *Slici 45.* su prikazani apsorpcioni ATR-FTIR spektri ispitivanih biofilmova. Analizom dobijenih spektara se može uočiti da nema značajne razlike između spektra hitozanskog filma i hitozanskog filma sa dodatim EUK.



**Slika 45. ATR-FTIR spektri: pčelinjeg voska, hitozanskog biofilma (0(C)) i hitozanskog biofilma sa 0.8% (v/v) etarskog ulja kima i rastućom koncentracijom pčelinjeg voska ( $\text{kg/m}^3$ ): 0, 18, 36, 54, 72, 90**

Kada je u film dodat pčelinji vosak u koncentraciji  $18 \text{ kg/m}^3$  došlo je do značajne promene u izgledu spektra hitozana (*Slika 46*). Koeficijent korelacije ova dva spektra iznosi 0.2670, što potvrđuje značajnu razliku u izgledu spektara. Široka apsorpciona traka na oko  $3500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ , koja odgovara vibracijama istezanja veza  $\text{-N-H}$  i  $\text{-OH}$ , kao i intermolekularnim vodoničnim vezama između molekula hitozana se smanjuje po intenzitetu, najverovatnije usled drugačijeg pakovanja molekula hitozana u filmu iz emulzije, kao i usled interakcije čestica voska i hitozanskog matriksa. Dve apsorpcione trake na  $2915.90 \text{ cm}^{-1}$  i  $2848.16 \text{ cm}^{-1}$ , koje predstavljaju vibracioni mod simetričnog i asimetričnog istezanja  $\text{-CH}_2$  grupe su se značajno povećale po intenzitetu, zbog velikog broja ovih grupa koje vode poreklo iz dugačkih alifatičnih lanaca sastojaka voska i povećanje ovih apsorpcionih traka govori o povećanju hidrofobnosti površine filma. Sve tri amid trake: amid I, amid II i amid III na  $1632.63 \text{ cm}^{-1}$ , na  $1539.1 \text{ cm}^{-1}$  i na  $1325.59 \text{ cm}^{-1}$  se nalaze i u filmu sa voskom, ali je intenzitet ovih traka smanjen. I ostali karakteristični pikovi hitozanskog spektra su prisutni smanjenog intenziteta u spektru filma sa  $18 \text{ kg/m}^3$  voskom. Novi pikovi koji nisu bili prisutni u hitozanskom filmu su se pojavili u spektrima filmova sa voskom: na  $1736.28 \text{ cm}^{-1}$ , pik koji

potiče od karbonilne grupe estara iz voska, na  $1736.28\text{ cm}^{-1}$  i  $1717.37\text{ cm}^{-1}$ , pikovi koji potiču od  $\text{CH}_2$  vibracione trake savijanja,  $1472.37\text{ cm}^{-1}$  traka  $\text{CH}_3$  simetrične vibracije,  $729.48\text{ cm}^{-1}$  i  $719.04\text{ cm}^{-1}$ , vibracione trake klackanja  $\text{CH}_2$  grupe.



Slika 46. ATR-FTIR spektar hitozanskog biofilma sa 0.8% (v/v) etarskog ulja kima i  $18\text{ kg/m}^3$  pčelinjeg voska

Sa povećanjem koncentracije voska u filmu svi karakteristični pikovi hitozanskog spektra se smanjuju, a novonastali pikovi koji vode poreklo iz voska postaju izraženiji, da bi filmovi sa  $72\text{ kg/m}^3$  i  $90\text{ kg/m}^3$  voska imali spektar koji odgovara prikazanom spektru pčelinjeg voska. Koeficijent korelacije između spektra hitozanskog filma i spektara filmova sa rastućom koncentracijom pčelinjeg voska opada i za film sa  $36\text{ kg/m}^3$  voska iznosi 0.1932, za film sa  $54\text{ kg/m}^3$  voska 0.1566, sa  $72\text{ kg/m}^3$  voska 0.1154 i sa  $90\text{ kg/m}^3$  voska 0.1160. Za razliku od izrazito male korelacije između spektara hitozanskog filma i filmova sa voskom, koeficijenti korelacije između filmova sa rastućom koncentracijom voska iznose, međusobno, preko 0.9 i govore o manjim promenama u izgledu spektra sa povećanjem koncentracije voska. Dodavanje rastuće koncentracije pčelinjeg voska u film je dovelo do najpravilnijih promena u delu spektra  $3871.40\text{--}3868.50\text{ cm}^{-1}$ .



Upotrebom softvera "TQ Analyst", izvršena je kvantitativna analiza (Berov zakon) dobijenih spektara i dobijena je zavisnost porasta navedenog pika od koncentracije dodatog voska:

$$y=(0.164e^{-4})x+(0.101e^{-3}) \quad (14)$$

Izračunate i izmerene vrednosti su pokazale jako dobru korelaciju (koeficijent korelacije=0.99628) (Prilog 4).

Da bi se utvrdila stabilnost proizvedenih biofilmova, filmovi su snimani obostrano (Prilog 3). Ni kod jednog proizvedenog filma nije uočena razlika u spektru između gornje i donje površine filma, što govori o stabilnosti filmogene emulzije tokom procesa sušenja filma, odnosno govori o tome da nije došlo do razdvajanja faza unutar filma (Zivanovic *i sar.*, 2007). Određeni koeficijenti korelacije za sve filmove sa voskom između spektara snimljenih sa dve strane filma su preko 0.9. Zbog izrazito visoke koncentracije voska u biofilmovima, vosak potpuno preuzima spektar filma, pa je možda i delimično razdvajanje faza maskirano, tj. nije moglo biti uočeno snimanjem u ATR-FTIR tehnici, iako je vizuelno bilo moguće uočiti određenu razliku u izgledu gornje i donje površine koja može ukazivati da je ipak u određenoj meri (ne potpuno) došlo do razdvajanja faza i do formiranja slojeva sa rastućom koncentracijom voska od dna prema vrhu filma.

### **Antioksidativna aktivnost**

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala (DPPH• test) je jedan od najčešće korišćenih testova za ispitivanje antioksidativnog potencijala prirodnih komponenti "in vitro". Ovaj test ukazuje da analizirana supstanca može hvatati slobodne radikale, delujući kao donor vodonikovog atoma ili kao donor elektrona (Prior *i sar.*, 2005). Aktivnost u hvatanju DPPH• radikala kod hitozana se zasniva na aktivnosti slobodnih amino i hidrosilnih grupa, koje mogu biti donori elektrona ili atoma vodonika. Analize na derivatima hitozana su ukazale da su verovatno hidrosilne grupe značajnije aktivne grupe. Aktivnost hitozana zavisi od većeg broja faktora: koncentracije, molekulske mase, stepena deacetilovanosti i dužine trajanja testa (Kim, i Thomas, 2007; Yen *i sar.*, 2008; Wan *i sar.*, 2013). Dodatno, varijacije u rezultatima potiču i od činjenice da aktivnost hitozanskog molekula, merena u hitozanskom rastvoru i biofilmu, nije ista. Hitozan u filmu, očekivano, ima nižu antioksidativnu aktivnost zbog jakim vodoničnih međumolekulskih veza koje blokiraju aktivne grupe. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti samog hitozanskog filma, kao i hitozanskog filma sa dodatkom EUO i EUK, prikazani su na *Grafiku 28*. Sa *Grafika 28*. se uočava da je aktivnost samog hitozanskog filma bila ograničena i iznosila je 11.64%, nakon 2.5 h, a 28.96%, nakon 24h trajanja testa. Tokom vremena kontakta sa reaktivnom supstancom izmerena aktivnost hitozanskog filma je numerički rasla, iako statistički ovaj porast nije bio značajan ( $p>0.05$ ), što je u skladu sa literaturnim podacima (Wan *i sar.*, 2013). Isti rezultati za antioksidativnu aktivnost hitozanskog filma od oko 11% su prikazani u literaturi (Moradi *i sar.*, 2012; Martins *i sar.*, 2012) za 2% (w/v) film na bazi hitozana srednje molekulske mase sa sličnim stepenom deacetilovanosti kao u ovoj tezi za koji je antioksidativna aktivnost merena nakon rastvaranja filma, kao i za 1.5% film u mlečnoj kiselini na bazi hitozana nepoznate molekulske mase i stepena deacetilovanosti 95%, nakon 3h. Prema literaturnim podacima, zabeležene su i niže

vrednosti za antioksidativnu aktivnost u rastvoru DPPH• radikala hitozanskog biofilma. Hitozanski film 2% (w/v) od hitozana nepoznatog opsega molekulskih masa i visokog stepena deacetilovanosti (95%), pokazao je aktivnost ispod 5% nakon 24 h, a vrednost oko 5% nakon 24 h je pokazao hitozanski film iste koncentracije, takođe od hitozana nepoznate molekulske mase i stepena deacetilovanosti 80-95% (Siripatrawan i Harte, 2010; Wang *i sar.*, 2013). Film na bazi niskoviskoznog hitozana 2% (w/v), stepena deacetilovanosti 85%, nije pokazao antioksidativnu aktivnost u rastvoru DPPH• radikala, kao ni film na bazi niskoviskoznog hitozana 1% (w/v) stepena deacetilovanosti 90% i 5% PVA u različitim odnosima, oba rezultata prikazuju aktivnost nakon 24h (Portes *i sar.*, 2009; Kanatt *i sar.*, 2012). Hitozan visoke molekulske mase je pokazao izraženiju aktivnost prema hidroksil radikalu ( $\bullet\text{OH}$ ) i superoksid anjon radikalu ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) u odnosu na aktivnost prema DPPH• radikalu, tako da je moguće da pravi antioksidativni potencijal ispitivanih biofilmova nije moguće uočiti samo DPPH• testom. Obzirom na prikazanu nisku vrednost antioksidativne aktivnosti hitozanskog filma, u film se inkorporiraju niskomolekularne aktivne supstance da bi se ovo svojstvo hitozanskog filma optimizovalo.

Dodatkom 0.8% EUO u film, postignuta je izražena antioksidativna aktivnost, koja je došla do izražaja već nakon 3h kontakta u rastvoru DPPH• radikala. Numerički, ova vrednost raste do 24h kontakta, ali je vrednost aktivnosti za sva tri analizirana vremena kontakta oko 90% ( $p > 0.05$ ). Kada je ista koncentracija EUK od 0.8% dodata u biofilm, postignuto je povećanje merene aktivnosti samog hitozanskog filma, ali u manjoj meri u odnosu na EUO. Za EUK je vreme kontakta u rastvoru DPPH• radikala od izuzetnog značaja ( $p < 0.05$ ). Tokom vremena, sve veća količina ulja biva dostupna u rastvoru, odnosno ulje se postupno ispušta iz matriksa filma i merena antioksidativna aktivnost raste sa vremenom, ostvarujući maksimum od  $(81.1 \pm 0.64)\%$  nakon 24h. Da bi se postigla aktivnost od  $>90\%$  bilo je potrebno dodati duplo veću koncentraciju EUK u odnosu na EUO.

Veliki broj autora je radio na optimizaciji antioksidativnih svojstava hitozana. Dva osnovna pravca su derivatizacija samog hitozana ili inkorporiranje aktivne supstance u hitozanski film. Jedna grupa autora je u film dodavala čiste supstance dokazane antioksidativne aktivnosti:  $\alpha$ -tokoferol, kurkuminoide, karvakrol, polifenole zelenog čaja; dok su drugi u hitozanski film dodavali kompleksne prirodne aktivne supstance: ekstrakt zelenog čaja, etarsko ulje *Thymus moroderi* i *Thymus piperella*, etarsko ulje *Zataria multiflora Boiss* i ekstrakt semenki grožđa, ekstrakt nane *Mentha spicata L.* i kore nara (*Punica granatum*), etarsko ulje timijana (Ruiz-Navajas *i sar.*, 2013; Siripatrawan i Harte, 2010; Portes *i sar.*, 2009; Kurek *i sar.*, 2014; Martins *i sar.*, 2012; Moradi *i sar.*, 2012; Wang *i sar.*, 2013; Kanatt *i sar.*, 2012; Altiok *i sar.*, 2010). Kada je u hitozanski film dodato 0.5%, 1% i 1.5% karvakrola, sposobnost hvatanja DPPH• radikala je povećana od 2.6 do 4.8 puta, u zavisnosti od koncentracije karvakrola, a sposobnost hvatanja ABTS<sup>+</sup> radikala je povećana oko 4.5 puta, nezavisno od dodate koncentracije karvakrola. Dodatkom 0.1%  $\alpha$ -tokoferola, aktivnost u hvatanju DPPH• radikala je povećana na preko 97% nakon 3h. Dodatkom od 0.2% do 0.8% polifenola zelenog čaja u hitozanski film, slično kao i sa ekstraktom zelenog čaja u koncentraciji 2% do 20%, postignuta je aktivnost filma u hvatanju slobodnih radikala od 30% do 60%, a sličnu aktivnost je pokazao i film sa različitim kombinacijama koncentracija

etarskog ulja *Zataria multiflora* Boiss i ekstrakta semenki grožđa. Maksimalna antioksidativna aktivnost za filmove sa ekstraktom nane i kore nara bila je oko 80% nakon 24h.

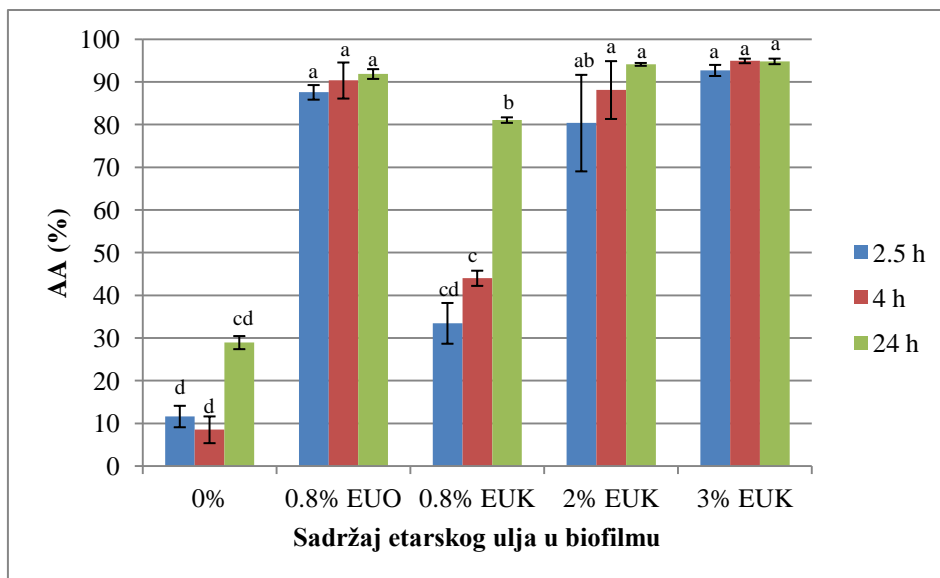
Poredeći rezultate dobijene za EUK i EUO, u ovoj disertaciji, može se reći da su oba ulja pokazala izuzetnu antioksidativnu aktivnost. Etarsko ulje kima (EUK) je pokazalo aktivnost koja je uporediva sa većinom drugih analiziranih supstanci dodatih u hitozanski film, u istoj koncentraciji, ili sa sintetičkim antioksidansom BHA (400  $\mu$ M), dok je EUO pokazalo aktivnost koja nadmašuje većinu testiranih prirodnih supstanci, i može se porediti sa  $\alpha$ -tokoferolom (0.1%) i askorbinskom kiselinom (1000  $\mu$ M) (Norajit *i sar.*, 2010). Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za EUK i EUO. Sposobnost hvatanja DPPH• radikala u zavisnosti od koncentracije EUK, koju su dali Samojlik *i sar.* (2010), data je u Tabeli 17.:

**Tabela 17. Antioksidativna aktivnost EUK upotrebom DPPH• radikal testa (Samojlik *i sar.*, 2010)**

	koncentracija					IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
	2.5 $\mu$ g/mL	5 $\mu$ g/mL	7.5 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL	12.5 $\mu$ g/mL	
EUK	34.69	58.75	73.71	85.41	91.57	4.1

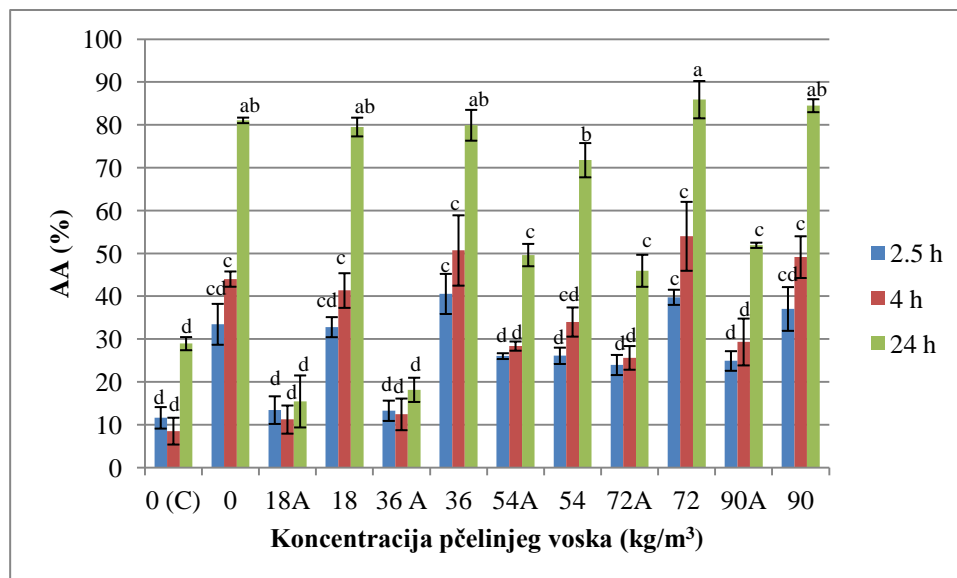
Osnovne komponente EUK, keton karvon i terpen limonene, su dokazane antioksidativne komponente (Elmastaša *i sar.*, 2006; Aggarwal *i sar.*, 2002; Samojlik *i sar.*, 2010). EUO i njegove osnovne komponente: karvakrol, timol, c-terpinen i p-cimen su intenzivno ispitivani i njihova antioksidativna aktivnost je potvrđena u većem broju različitih ispitivanja (Almeida-Doria i Regitano-Dárce, 2000; Avila-Sosa *i sar.*, 2010; Camo *i sar.*, 2011; Kulisic *i sar.*, 2004; Lagouri *i sar.*, 1993; Milos *i sar.*, 2000).

Da bi antioksidativni efekat EUK u manjoj koncentraciji došao do izražaja, potrebno je duže vreme inkubacije filma u DPPH• rastvoru. Ovo je najverovatnije posledica postupnog otpuštanja EUK iz matriksa biopolimera, što je u skladu sa tabelom u kojoj je navedena aktivnost rastuće koncentracije EUK. Pored ovoga, izučavajući sposobnost EUK u hvatanju DPPH• radikala, zapaženo je odloženo dejstvo nekih od aktivnih sastojaka EUK (Samojlik *i sar.*, 2010) Slično je i kod filmova sa tetrahidrokurkuminoid derivatima, intenzitet hvatanja DPPH• radikala rastao sa vremenom, istom brzinom kojom je teklo i otpuštanje aktivne supstance iz hitozanskog filma. Za dva različita derivata je brzina otpuštanja iz filma bila značajno drugačija, pa je za postizanje ravnotežnog stanja, kada je dalje otpuštanje minimalno, kod jedne aktivne supstance bilo potrebno 4 h, a kod druge 20 h zbog jače interakcije sa hitozanskim matriksom (Portos *i sar.*, 2009). Slično je u radu sa ekstraktom nane i kore nara (Kanatt *i sar.*, 2012) uočen porast aktivnosti tokom trajanja testa od 24h. U ovoj disertaciji je za 0.8% EUK bilo potrebno minimum 24h, a možda i nakon 24h ravnoteža nije postignuta, te bi produženi test mogao pokazati dalji rast antioksidativne aktivnosti. Za film sa EUO dinamika otpuštanja nije mogla biti uočena jer je već kod prve tačke, nakon 2.5h, postignuta maksimalna antioksidativna aktivnost. Za efikasnu formulaciju antioksidativnog omotača, koncentracija od 0.8% EUK je dovoljna, dok je kod EUO moguće koristiti nižu koncentraciju.



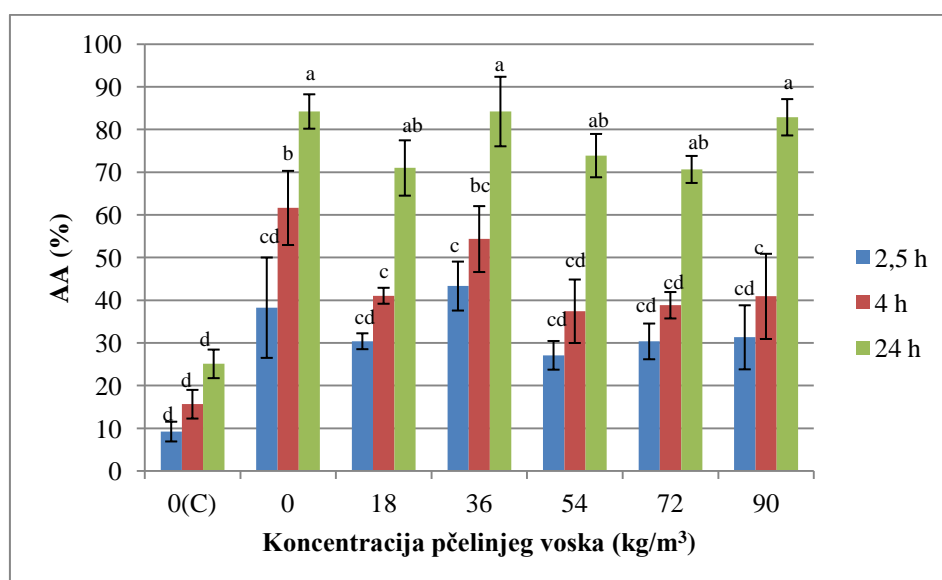
**Grafik 28.** Antioksidativna aktivnost biofilmova u zavisnosti od sadržaja (% v/v) etarskog ulja origana i kima i vremena trajanja testa (2.5 h, 4 h i 24 h). Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Na *Grafiku 29.* su prikazani rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti hitozanskih filmova sa rastućom koncentracijom pčelinjeg voska sa EUK i bez EUK (označeni slovom A). U filmovima sa EUK, nezavisno od koncentracije voska vrednost antioksidativne aktivnosti nakon 2.5 h, se kretala oko (30 – 40)%, nakon 4 h oko (40 – 50)%, a nakon 24h oko 80 %. Kao jače antioksidativno sredstvo, EUK je nosioc aktivnosti i ovde se efekat veće koncentracije pčelinjeg voska ne uočava. Isto kao i u filmu bez voska, aktivnost filma raste tokom vremena. Kod filmova bez EUK, pri većim koncentracijama voska,  $54 \text{ kg/m}^3$  i više, uočava se blagi porast aktivnosti filmova, koji najverovatnije potiče od doprinosa pčelinjeg voska. Dve grupe komponenti voska su pokazale antioksidativno dejstvo u analizama “*in vivo*”. Jednu grupu čini mešavina viših alifatičnih primarnih alkohola (D-002), a drugu polifenoli iz pčelinjeg voska (Anilakumar i Khanum, 2009; Daisy *i sar.*, 2013; Molina *i sar.*, 2001). I aktivnost filmova bez EUK raste tokom vremena, dostižući za filmove sa koncentracijom voska preko  $54 \text{ kg/m}^3$  vrednost od oko 50% nakon 24h, što je značajno više u odnosu na sam hitozanski film ( $p < 0.05$ ).



**Grafik 29.** Antioksidativna aktivnost biofilмова u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska ( $\text{kg/m}^3$ ) i vremena trajanja testa (2.5 h, 4 h i 24 h). Film 0 (C) je čist hitozanski biofilm, a filmovi sa oznakom A su filmovi bez EUK. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Na *Grafiku 30.* je prikazana antioksidativna aktivnost filmova 30 dana nakon sušenja. Filmovi su stajali na sobnim uslovima. Poredeći rezultate aktivnosti filmova odmah nakon sušenja i nakon 30 dana stajanja, ne uočava se značajna razlika ( $p > 0.05$ ). Pokazano je da su sintetisani filmovi stabilni u navedenom roku. Za razliku od ovih rezultata, kada su u film na bazi hitozana dodati polifenoli zelenog čaja, nakon 12 dana je aktivnost filmova počela polako opadati (Wang *i sar.*, 2013).



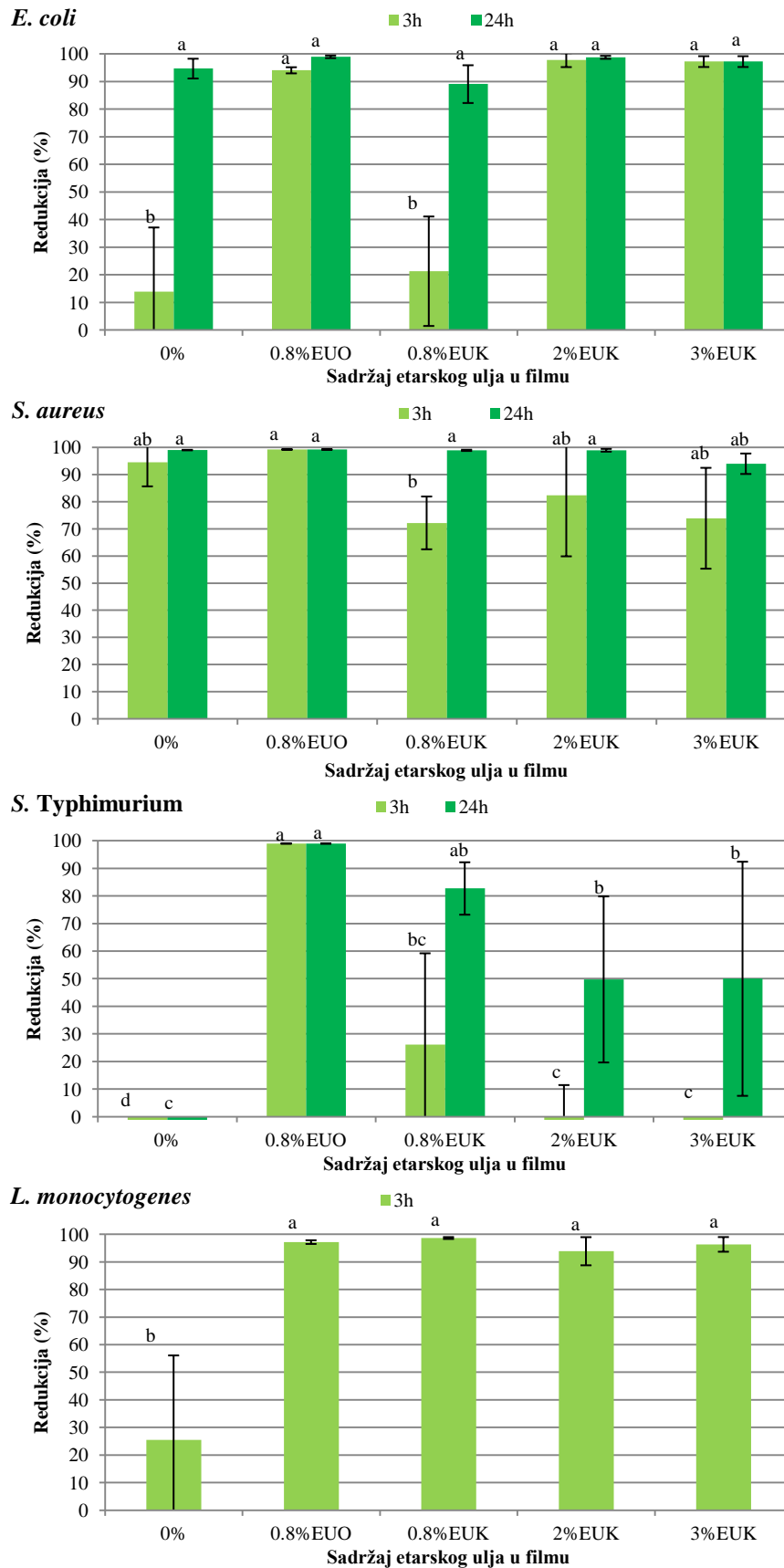
**Grafik 30.** Antioksidativna aktivnost biofilмова nakon 30 dana od proizvodnje u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska ( $\text{kg/m}^3$ ) i vremena trajanja testa (2.5h, 4h i 24h). Film 0 (C) je čist hitozanski biofilm. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

## Antimikrobna aktivnost

Pre analize antimikrobne aktivnosti hitozanskih biofilmova, analizirana je vijabilnost ćelija test-mikroorganizama u datim uslovima ispitivanja. Analizom vijabilnosti ćelija u fosfatnom puferu pH 7.2 pokazano je da primenjeni pufer nema značajan uticaj na viabilnost ćelija *E. coli*, *S. aureus* i *S. Typhimurium*, jer nije došlo do značajnog smanjenja ili povećanja broja ćelija. Međutim, u slučaju *L. monocytogenes*, zapaženo je značajno smanjenje broja ćelija nakon 24 h, pa je delovanje biofilmova na *L. monocytogenes* ispitano samo nakon 3 h (Prilog 5). Imajući u vidu mehanizam delovanja hitozana velike molekulske mase na mikrobnu ćeliju, analiziranje aktivnosti u neutralnom opsegu pH može dovesti do lošijih rezultata, jer je aktivnost zasnovana na interakciji polikatjona i ćelijske membrane. Mnogi autori su pokazali razliku u efikasnosti hitozana u različitim uslovima pH (Wang, 1992; No *i sar.*, 2002; Helander *i sar.*, 2001). Ipak, obzirom da je cilj ove disertacije bio da se analizira aktivnost hitozanskog filma kakav je on u primeni, a ne hitozana u rastvoru, a film u čvrstom stanju je moguće održati u suspenziji jedino pri pH 6.5 i više. Međutim i u 0.3 mM puferu pH 7.2 je došlo do bubrenja, kidanja i rastvaranja filma, najverovatnije zbog probijanja kapaciteta pufera i snižavanja vrednosti pH pod dejstvom sirćetne kiseline iz filma, pa je morao biti upotrebljen pufer deset puta veće koncentracije. Iako je broj naelektrisanih grupa hitozana u korišćenom puferu manji nego pri nižim pH, on je i dalje značajan jer je ova jačina pufera određena kao granična u kojoj je integritet filma mogao biti održan.

Na *Grafiku 31.* je prikazana antimikrobna aktivnost merena kao redukcija broja mikroorganizama u suspenziji, u kontaktu sa hitozanskim biofilmom sa i bez dodatka EUK i EUO. Sam hitozanski film je ispoljio značajno antimikrobno dejstvo u odnosu na bakterije *E. coli*, i to  $(94.72 \pm 3.58)\%$  nakon inkubacije od 24 h i *S. aureus*,  $(94.56 \pm 8.92)\%$  nakon 3h i  $(99.02 \pm 0.10)\%$  nakon 24 h inkubacije. Najslabije izražena aktivnost određena je u suspenziji bakterija *S. Typhimurium*, gde je, u prisustvu hitozanskog filma došlo do porasta broja ćelija. Velika otpornost bakterije *S. Typhimurium* na dejstvo hitozana navodi se u literaturi (Wang i Guang-Hua, 1992). Veća minimalna inhibitorna koncentracija hitozana je bila potrebna da se inhibira rast *S. Typhimurium* u odnosu na *S. aureus*, *E. coli* i *Y. enterocolitica*. Jedino je *L. monocytogenes* bila otpornija pri pH 5.5.

U literaturi, rezultati ispitivanja delovanja hitozana velike molekulske mase na bakterije *E. coli* i *S. Typhimurium* (Fouad, 2008; No *i sar.*, 2002) su pokazali da, u kiseloj sredini, hitozan u koncentraciji 0.025% dovodi do promene propustljivosti spoljne membrane ćelija. Pri pH 7.2 ovaj efekat vise nije bio uočljiv za *S. Typhimurium*. Minimalna inhibitorna koncentracija za gram negativne bakterije je ustanovljena oko 0.1% hitozana, dok je za *S. Typhimurium* efikasnost ove koncentracije zavisila od molekulske mase hitozana, pa bi se moglo reći da za nju minimalna inhibitorna koncentracija može biti viša. Za gram pozitivne bakterije, minimalna inhibitorna koncentracija hitozana u rastvoru je čak 1000 puta manja.



**Grafik 31.** Antimikrobna aktivnost hitozanskih filmova sa dodatkom EUO i EUK prema *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, izražena kao redukcija vijabilnih ćelija (%). Film 0 (C) je čist hitozanski biofilm. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

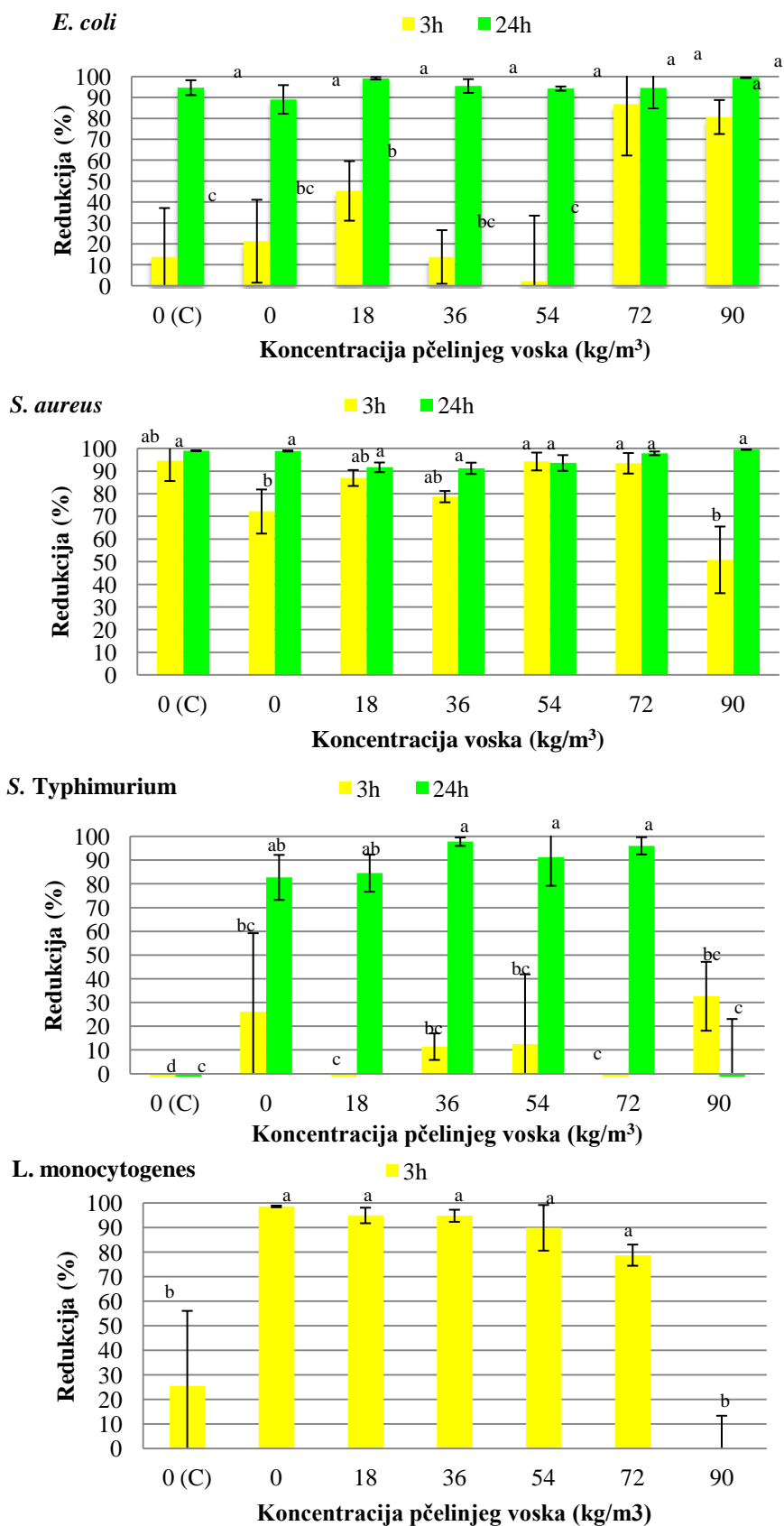
Najverovatnije da u ovoj tezi, zbog uslova pH i broja aktivnih grupa u molekulima hitozana, hitozan nije ispoljio antimikrobno dejstvo prema *S. Typhimurium*. Pored navedenog, u koncentracijama nižim od minimalne inhibitorne koncentracije, pokazano je da prisustvo hitozana može da stimuliše rast bakterija *E. coli*. Moguće je da je ovo bio slučaj i kod *S. Typhimurium* (Liu *i sar.*, 2006). Rezultati dobijeni za redukciju broja ćelija *E. coli* odgovaraju rezultatima koje su dobijeni za aktivnost rastvora hitozana 0.1% u sirćetnoj kiselini. Pokazano je da aktivnost hitozana prema *E. coli* zavisi od vremena inkubacije, dok je aktivnost prema *S. aureus* bila nezavisna od vremena inkubacije i puna aktivnost je ispoljena nakon 5 min, što je u skladu sa literaturnim rezultatima (Liu *i sar.*, 2004). Etarsko ulje origana (EUO) se pokazalo kao izuzetno jak antimikrobni agens. Dodatkom EUO u matriks filma, aktivnost filma je značajno povećana i redukcija svih ispitivanih vrsta bakterija od blizu 100% nakon 3h inkubacije je postignuta. Poboljšanje aktivnosti filma je zapaženo kod svih mikroorganizama, a posebno je značajno za *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes* gde sam film nije pokazao dovoljnu aktivnost. Ono što je zanimljivo je da filmovi sa EUO deluju trenutno u kontaktu sa suspenzijom mikroorganizama, pa je tako inicijalni broj ćelija za samo 5 min kontakta (nulto merenje) smanjen za 1 log jedinicu kod *E. coli*, više od 2 log jedinice za *S. Typhimurium* i 2 log jedinice za *L. monocytogenes*. Kada se film nađe u vodenoj sredini, dolazi do hidratacije i veoma brzo do otpuštanja ulja iz filma u spoljašnju sredinu (Altiok *i sar.*, 2010; Kurek *i sar.*, 2012). Literaturni podaci o minimalnoj inhibitornoj i minimalnoj biocidnoj koncentraciji EUO za sve navedene mikroorganizme su iste i iznose 1.25 µg/ml-10.0 µg/ml, što govori o izuzetno izraženoj antimikrobnoj aktivnosti EUO (Mellencamp *i sar.*, 2011). Izuzetno jako antimikrobno, kao i prethodno opisano antioksidativno dejstvo hitozanskog filma sa EUO je odlična polazna tačka u upotrebi ovog filma kao aktivnog ambalažnog materijala, ali je ograničavajuć faktor uticaj navedenog filma na senzorska svojstva hrane.

Kada se analizira uticaj dodatka rastuće koncentracije EUK u film, zapaža se pozitivan uticaj ovog etarskog ulja na antimikrobnu aktivnost hitozanskog filma. Jedini mikroorganizam gde doprinos EUK nije uočljiv, najverovatnije zbog izraženog uticaja samog hitozanskog filma je *S. aureus*. Dodatak EUK u količini 0.8% je uticao na poboljšanje antimikrobne aktivnosti hitozanskog filma prema *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes*, što je izuzetno značajno jer je aktivnost samog hitozanskog filma prema ova dva mikroorganizma bila slabo izražena ili nije uopšte registrovana. Koncentracija od 2% EUK je poboljšala aktivnost filma samo prema *E. coli* i to u smislu da je delovanje u odnosu na sam hitozanski film ubrzano. Viša koncentracija EUK nije dala dodatni doprinos u analiziranoj aktivnosti filma. Kao i kod samog hitozanskog filma, aktivnost filma sa EUK raste sa vremenom inkubacije, najverovatnije usled postepenog otpuštanja EUK, verovatno na sličan način kao što je prikazano postepeno otpuštanje limonena iz hitozanskog filma u kontaktu sa različitim rastvorima simultantima različitih prehrambenih namirnica (Sánchez-González *i sar.*, 2011). Literaturni podaci za aktivnost EUK variraju, od izražene antimikrobne aktivnosti, preko umerene do izveštaja da prema većini gram pozitivnih i gram negativnih bakterija nije utvrđena aktivnost EUK. U ovoj disertaciji je aktivnost EUK potvrđena i rezultati su u skladu sa rezultatima Mohamed *i sar.* (2013) koji su pokazali da je aktivnost EUK izraženija u odnosu na etarsko ulje mirođije, matičnjaka, bosiljka i korijandera jer je dovelo do pojave



zone bez rasta kod četiri (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* i *S. Typhimurium*) od pet testiranih bakterija. Najmanje podložna bakterijska vrsta je bila *E. coli*. Minimalna inhibitorna koncentracija za sve testirane bakterije je bila 3 µl/ml. Alboofetileh *i sar.* (2014) su publikovali rezultate u kojima je prikazana znatno manje izražena aktivnost EUK za koju je konstatovana slaba aktivnost prema *L. monocytogenes* i *E. coli*, dok ulje nije pokazalo aktivnost prema *S. aureus*. U radu Cvijović *i sar.* (2010) je, nasuprot tome, aktivnost prema *S. aureus* bila najviše izražena. Razlika u rezultatima za antimikrobnu aktivnost EUK najverovatnije potiče od razlika u sastavu samog ulja. U ovoj tezi je za hitozanski film sa 0.8% EUO i 2% EUO dobijena vrednost redukcije broja svih testiranih vrsta bakterija od >80% što je, zajedno sa prethodno pokazanim antioksidativnim svojstvima, odlična preporuka za upotrebu ovog filma kao aktivnog ambalažnog materijala.

Na *Grafiku 32.* je prikazan procenat redukcije vijabilnih ćelija četiri analizirane vrste bakterija u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska u filmu. Za *E. coli*, redukcija koja je posledica dejstva hitozanskog filma i hitozanskog filma sa 0.8% EUK od oko 90% nakon 24h je ostala nepromenjena sa dodatkom voska do koncentracije 54 kg/m<sup>3</sup>. Sa dodatkom većih koncentracija pčelinjeg voska, 72 kg/m<sup>3</sup> i 90 kg/m<sup>3</sup>, dolazi do povećanja antimikrobne aktivnosti filma, pa redukcija vijabilnih ćelija već nakon 3 h inkubacije iznosi više od 80%. Ovaj porast aktivnosti filma sa dodatkom veće koncentracije voska predstavlja doprinos aktivnosti koju je ispoljio sam vosak prema bakteriji *E. coli*. U radu koji je ispitivao uticaj ekstrakta pčelinjeg voska u metanolu i etanolu na pet vrsta patogenih bakterija, tri vrste mikroskopskih gljiva i sedam vrsta kvasaca pokazana je aktivnost srednjeg intenziteta, koja zavisi od vrste upotrebljenog rastvarača. *E. coli* je najviše inhibirana upotrebom ekstrakata u 70% etanola i 70% metanola i ovde aktivnost doseže 38% aktivnosti hloramfenikola (Kacaninova *i sar.*, 2012). U radu koji je analizirao uticaj premaza na bazi hitozana, pčelinjeg voska i etarskog ulja limete i timijana na *E. coli DH5a* i *R. stolonifer* „*in vitro*“ i „*in vivo*“ u eksperimentu manjeg obima i polu komercijalnom obimu, na paradajzu u tri faze zrelosti ploda na dve temperature, 12° C i 25° C, pokazano je da je u oba eksperimenta, „*in vitro*“ i „*in vivo*“, u oba testirana obima, premaz na bazi hitozana i pčelinjeg voska potpuno inhibirao rast bakterije (Ramos-García *i sar.*, 2012). U daljoj analizi doprinosa pčelinjeg voska u aktivnosti biofilma, filmovi 0 (C), 0, kao i filmovi sa rastućom koncentracijom voska su iz suspenzije mikroorganizama na kraju testa prebačeni na petri ploče sa nezasejanom opštom hranljivom podlogom i ploče su zatim inkubirane 24 h, na 37 °C. Očekivano je da ukoliko film ima bilo bakteriostatsko ili baktericidno delovanje neće doći do rasta bakterija u kontaktu sa filmom, a ukoliko postoji bakteriostatsko ili baktericidno delovanje EUK koje može da difunduje iz filma u podlogu neće doći ni do rasta bakterije u okolini filma (Leceta *i sar.*, 2013; Nadarajah, 2005; Guirguis *i sar.*, 2013; Pranoto *i sar.*, 2005).



**Grafik 32.** Antimikrobna aktivnost hitozanskih filmova u zavisnosti od koncentracije pčelinjeg voska, izražena kao redukcija vijabilnih ćelija (%). Film 0 (C) je čist hitozanski biofilm. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

Rezultati nedvosmisleno ukazuju na doprinos pčelinjeg voska u inhibiciji rasta *E. coli* (Prilog 5). Za filmove 0 (C) i 0 uočen je rast kolonija mikroorganizama, kako oko filma, tako i ispod samog filma, dok kod filmova sa pčelinjim voskom nije bilo rasta ni ispod ni oko filma. Dodatak pčelinjeg voska najverovatnije doprinosi baktericidnom efektu filma, dok se za filmove bez voska može reći da mehanizam delovanja nije jasno baktericidan niti bakteriostatski, jer dolazi do rasta mikroorganizama u kontaktu sa filmom. Moguće je da se efekat delovanja u suspenziji zasniva na vezivanju bakterijskih ćelija za naelektrisane grupe filma, međutim ova interakcija nije dovela do nepovratnog oštećenja bakterijske ćelije. U redukciji broja vijabilnih ćelija *S. aureus* nije uočena razlika nakon dodatka pčelinjeg voska u odnosu na film bez voska. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Kacaninova *i sar.* (2012) koji su pokazali slabo izraženo dejstvo metanolnog i etanolnog ekstrakta pčelinjeg voska u inhibiciji rasta *S. aureus*, kao i sa rezultatima Al-Waili (2005) koji su pokazali rast srednjeg intenziteta *S. aureus* na podlozi koja sadrži pčelinji vosak. Iako su rezultati za redukciju ćelija *S. aureus* izvanredni za sam hitozanski film već nakon 3 h inkubacije i ostaju takvi do kraja trajanja testa od 24 h, ipak se dodatnim testom prebacivanja filma na kraju testa redukcije na opštu hranljivu podlogu i inkubiranja 24 h, na 37 °C uočava jasan rast kolonija ispod i oko filma (Prilog 5). Pretpostavlja se da je mehanizam delovanja hitozanskog filma sličan kao i kod *E. coli* jer kolonije *S. aureus* rastu i u dodiru sa filmom.

Kada se analizira uticaj povećanja koncentracije pčelinjeg voska na *S. Typhimurium* nema statistički značajne razlike ( $p > 0.05$ ) između filma bez voska i filmova nakon dodatka pčelinjeg voska (osim za film sa 90 kg/m<sup>3</sup> voska). Međutim, ako se umesto redukcije viabilnih ćelija (%) koja je prikazana na *Grafiku 32.* posmatra viabilnost odabranih bakterijskih kultura u kontaktu sa hitozanskim filmovima izraženoj kao broj viabilnih ćelija (log CFU/ml), rezultati su dati u *Prilogu 5.*, može se zapaziti da sa dodatkom pčelinjeg voska dolazi do povećanja aktivnosti filma, a ovo povećanje je posebno izraženo za filmove sa 36 kg/m<sup>3</sup> gde je srednja vrednost smanjenja broja viabilnih ćelija je iznosila 1.9 log jedinica i sa 54 kg/m<sup>3</sup> gde je iznosila 1.6 log jedinica. Za film bez voska srednja vrednost smanjenja broja viabilnih ćelija je iznosila oko 0.7 log jedinica. Sa dodatkom koncentracije od 90 kg/m<sup>3</sup> voska u film, uočava se značajni pad ( $p < 0.05$ ) redukcije vijabilnog broja ćelija u kontaktu sa filmom. Kako se sa *Grafika 32.* uočava, a ranije je prodiskutovano, aktivnost potiče od zajedničkog delovanja EUK dodatog u film i doprinosi dodatog pčelinjeg voska. Smanjenje aktivnosti ovog filma potiče najverovatnije od interakcije između voska u većoj koncentraciji i EUK, gde je moguće da je došlo do promene mehanizma ili odlaganja kontrolisanog otpuštanja EUK iz matriksa filma. Dopunskom analizom aktivnosti filmova prema *S. Typhimurium* potvrđene su prethodne hipoteze (Prilog 5). Nakon prebacivanja filmova na hranljivu podlogu i inkubacije, kod filma 0 (C) je došlo do rasta kolonija oko filma, kao i u dodiru sa filmom, dok kod svih filmova sa dodatim pčelinjim voskom rast izostaje ispod samog filma što potvrđuje bakteriostatsku aktivnost filmova, ali ne i baktericidnu jer se uočava rast kolonija na podlozi oko filma. Za *L. monocytogenes* se uočava da, u odnosu na film bez voska, sa dodatkom pčelinjeg voska u film nema razlike u aktivnosti filma sve do najveće dodate koncentracije od 90 kg/m<sup>3</sup>, gde se uočava značajni pad ( $p < 0.05$ ) redukcije vijabilnog broja ćelija u kontaktu sa filmom. Mehanizam ovog efekta je najverovatnije sličan kao i kod *S. Typhimurium*, a posebno imajući u vidu da aktivnost ovog filma najverovatnije u potpunosti potiče od EUK.

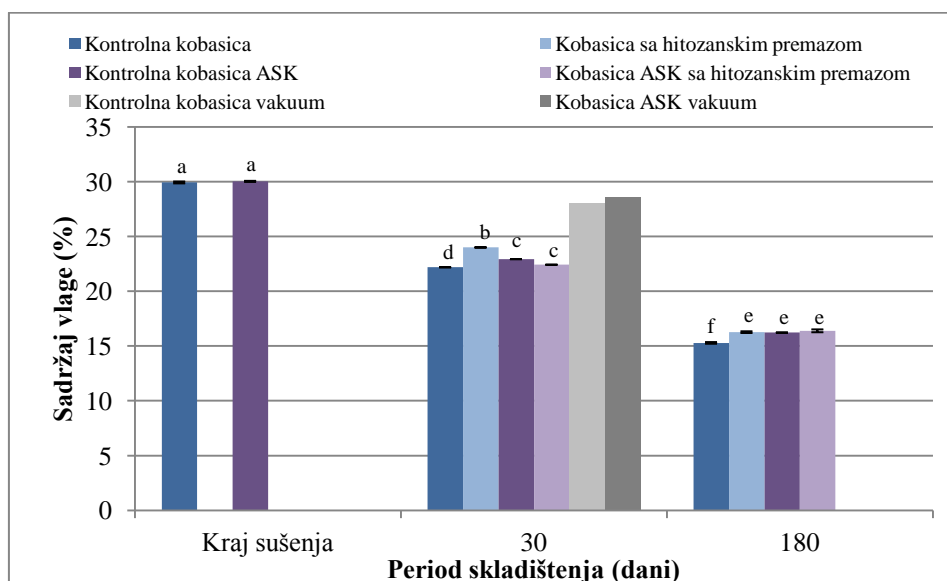
### 4.3.3. Primena hitozanskog premaza sa dodatkom etarskog ulja kima i pčelinjeg voska u zaštiti Petrovačke kobasice ("*Petrovská kolbása*")

Analizom svih rezultata karakterizacije filmova na bazi hitozana sa 0.8% EUK i dodatkom pčelinjeg voska, izdvojeni su, kao najpodesniji za primenu, filmovi sa  $18 \text{ kg/m}^3$  i  $36 \text{ kg/m}^3$ . U ovim filmovima je izbalansiran doprinos pčelinjeg voska u barijernom svojstvu za vlagu, kao i smanjenje osetljivosti na dejstvo vlage iz okoline, sa očuvanjem mehaničkih svojstava filmova i prihvatljivog senzorskog utiska. Za samu primenu u zaštiti kobasice tokom skladištenja je odabran premaz sa  $18 \text{ kg/m}^3$  voska.

#### Sadržaj vlage

Sadržaj vlage u ispitivanim kobasicama na kraju sušenja i nakon 30 i 180 dana skladištenja je prikazan na *Grafiku 33*. Tokom skladištenja, kobasica sa slojem hitozana je imala nešto viši sadržaj vlage u odnosu na kontrolnu kobasicu, dok kod kobasice sa ASK nije bilo razlike u sadržaju vlage između kobasice sa i bez hitozanskog zaštitnog sloja. Brzina propustljivosti vodene pare za film sa EUO koji je primenjen za zaštitu kobasice u prvom eksperimentu bila je  $(373.94 \pm 9.93) \text{ g/m}^2 \text{ 24h}$ , a odgovarajućeg laminiranog kolagenog omotača  $(372.59 \pm 49.02) \text{ g/m}^2 \text{ 24h}$ . Za film sa EUK, koji je primenjen u drugom eksperimentu, vrednost ovog parametra je iznosila  $(359.86 \pm 36.24) \text{ g/m}^2$ , a za laminirani kolageni omotač,  $(233.65 \pm 8.65) \text{ g/m}^2$ . U ovom eksperimentu je primenjen film sa brzinom propustljivosti vodene pare  $(65.12 \pm 11.26) \text{ g/m}^2 \text{ 24h}$ , odnosno laminirani omotač propustljivosti  $(94.18 \pm 18.54) \text{ g/m}^2$ . Smanjenje brzine propustljivosti vodene pare biofilma u odnosu na prethodne eksperimente je veće od 5.5 puta za biofilm i oko 2.5 puta za laminirani kolageni omotač. Iako su rezultati za propustljivost vodene pare kroz biofilme i laminirane kolagene omotače sa pčelinjim voskom značajno niži u odnosu na filmove i omotače bez voska, iz oba prethodna eksperimenta, ova optimizacija svojstava očigledno nije bila dovoljna da bi došlo do zaustavljanja gubitka vlage iz kobasice tokom skladištenja. Ako dobijene vrednosti za brzinu propustljivosti vodene pare kroz biofilm i laminirani omotač uporedimo sa orijentacionom vrednošću brzine propustljivosti vodene pare kroz LDPE od  $50 \mu\text{m}$  debljine, koja iznosi  $2.10 \text{ g/m}^2 \text{ 24h}$ , očigledno je da postignuta barijera za biofilme i dalje značajno zaostaje za komercijalnim polimernim materijalima. U radu Navarro-Tarazaga *i sar.* (2011), koji je analizirao svojstva biofilma na bazi hidroksipropilmetilceluloze sa pčelinjim voskom i zaštitna svojstva ovog premaza na šljivi, pokazano je, takođe, da dobra barijerna svojstva filma u primeni ne daju uvek očekivane rezultate. Kalo šljive tokom stajanja je smanjeno dodatkom voska od 20 g do 40 g u odnosu na polimer, a sa dodatkom veće količine voska, kalo plodova nije dalje opadalo iako je film sa većim sadržajem voća pokazao bolja barijerna svojstva za vlagu. Autori zaključuju da karakterizacija samog filma može služiti kao preliminarni skrining, ali da se pravi uticaj zaštitnog omotača može proučavati samo u primeni. U poređenju sa analiziranjem samog filma proizvedenog u laboratoriji, efekat u primeni zavisi i od rasporeda omotača na proizvodu, a posebno od toga da li se na površini proizvoda formira kontinuirani sloj ili filmogena emulzija zalazi u pore i neravnine na površini, što narušava kontinualnost prevlake i neminovno utiče na efikasnost. Iz ovog razloga su u ovoj tezi proučavana uporedo sa svojstvima biofilмова i svojstva laminiranih

kolagenih omotača, da bi se dobili što reprezentativniji rezultati koji su što bliži realnoj primeni. Na ovaj način su se neutralisali efekti neravnomernog rasporeda filmogene emulzije na kolagenom omotaču, efekat daleko veće debljine filma u odnosu na omotač, moguća interakcija između laminiranog i nosećeg sloja i sl. Ipak, u primeni, kolageni omotač ne stoji sam, već pranja uz kobasicu te su i njegova svojstva drugačija (pH kobasice, sadržaj vlage i masti u kobasici), sloj premaza koji se zadržava na kobasici je neravnomerniji i najverovatnije tanji usled slivanja jer kobasice više okačene za jedan kraj. Takođe, kobasice nisu stabilan i nepromenljiv sistem, već usled kala dolazi do skupljanja i nastajanja novih nabora, što može dovesti do pucanja osušenog laminiranog sloja na površini. Tyburcy i Kozyra (2010) su ispitivali adekvatnu formulaciju omotača formiranog iz koncentrovane emulzije polimera i lipidne frakcije. Formulacijom koja u 100 g vode sadrži 11 g želatina, 1.1 do 2.3 g karagenana, 40 g svinjske masti, 40 g pčelinjeg voska i 10 do 20 g glicerola, uspeli su da snize kalo poljske suve fermentisane kobasice kabanosy za 40% nakon 7 dana i 30% nakon 15 dana skladištenja na (4 – 6) °C. Sušenjem omotača nakon geliranja na 50 °C tokom 1.5 h, kalo kobasice je dodatno sniženo za još 20% nakon 7 dana. Kada je ovakav premaz upotrebljen na kobasici sa većim sadržajem vlage (barena kobasica frankfurter), efekat je bio još izraženiji i smanjenje kala je nakon 7 dana iznosilo preko 50%, nakon 14 dana oko 35%, a nakon 21 dana oko 20%.



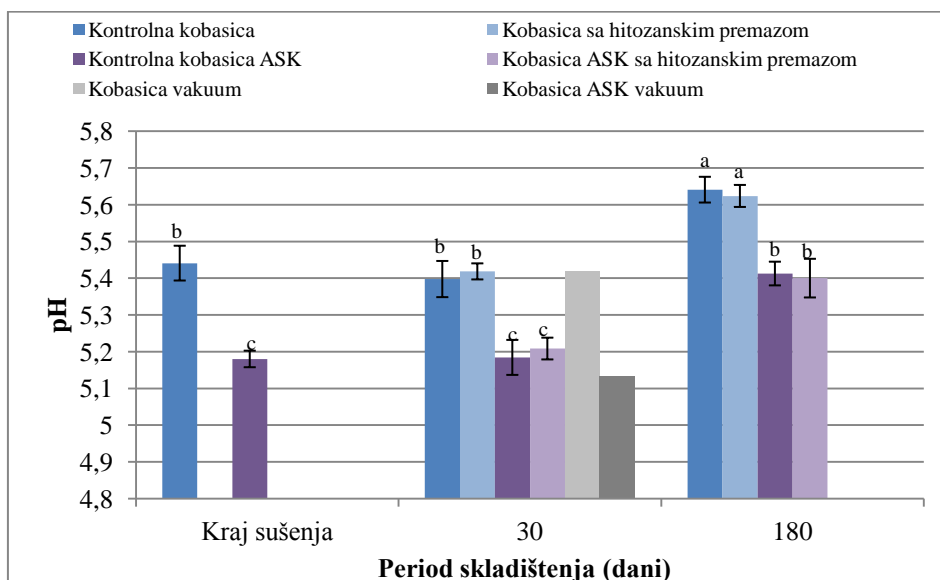
**Grafik 33. Sadržaj vlage (%) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka ASK stoji uz kobasicu sa autohtonom starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju, a različita slova a, b, c, d, e, f označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )**

U ovoj tezi je primenjen premaz u kojem je na 100 g vode dodato 3.6 g pčelinjeg voska, a najveći dodatak pčelinjeg voska koji je analiziran u tezi odgovara masi od 9 g voska u 100 g vode, za razliku od rada Tyburcy i sar. (2010), gde je datak lipidne frakcije bio daleko veći, 40 g pčelinjeg voska i 40 g masti na 100 g vode. U tako visokom sadržaju voska bilo je neophodno primeniti i značajnu količinu plastifikatora da ne dođe do pucanja sloja. Pored veće koncentracije hidrofobnih komponenti, vreme skladištenja je značajno kraće u odnosu na ovu tezu. Ni u jednom od tri eksperimenta u okviru ove teze, premazi na bazi hitozana nisu bili efikasni u smanjenju gubitka vlage iz kobasice tokom skladištenja. U prvom eksperimentu

nema nikakve razlike između kobasice sa i bez premaza hitozana, u drugom eksperimentu postoji minimalna razlika kod kobasice SK, a u ovom eksperimentu takođe je detektovana minimalna razlika i to za kobasicu bez ASK.

### Vrednost pH

Kao i u prethodnom eksperimentu, na kraju procesa sušenja je uočena razlika ( $p < 0.05$ ) u vrednosti pH između kobasice sa dodatom ASK ( $5.44 \pm 0.05$ ) i kobasice bez dodate ASK ( $5.18 \pm 0.02$ ) (Grafik 34). Kontrolna kobasica zadovoljava zahteve za kvalitet Petrovačke kobasice iz Tehnološkog elaborata (Petrović *i sar.*, 2007), tj. vrednost pH kobasice je  $pH > 5.4$  na kraju sušenja, dok je vrednost pH kobasice sa dodatom ASK na kraju sušenja niža od preporučene vrednosti. Ovo se može tumačiti kao delovanje mikroflora i u saglasnosti je sa sastavom dodate ASK (90% *Lactobacillus sakei* i 10% *Staphylococcus spp.*). Naime, pojačan rast i favorizacija laktobacila rezultovala je nižim pH na kraju sušenja (Šojić, 2013).



**Grafik 34.** Vrednost pH u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka ASK stoji uz kobasicu sa autohtonom starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ )

U obe grupe kobasica, kontrolnoj i kontrolnoj ASK je zapažen postepen porast vrednosti pH tokom skladištenja ( $p < 0.05$ ), da bi na kraju perioda skladištenja vrednosti pH iznosile  $5.64 \pm 0.04$ , za kontrolnu kobasicu i  $5.41 \pm 0.03$ , za kontrolnu kobasicu ASK. Prisustvo zaštitnog premaza na bazi hitozana nije dovelo do promene vrednosti pH kobasice ni u jednoj tački tokom skladištenja. Slično kao u prethodna dva eksperimenta, porast vrednosti pH tokom skladištenja je, najverovatnije, posledica razgradnje mlečne kiseline, do koje dolazi nakon što se potroše šećeri i/ili izraženoj proteolitičkoj aktivnosti prisutne mikroflora (*Staphylococcus spp.*) uz formiranje peptida, amino kiselina i amonijaka (Saláková *i sar.*, 2010; Kameník *i sar.*, 2012; Komprda *i sar.*, 2001; Bover-Cid *i sar.*, 1999).

Na osnovu izvedena tri eksperimenta u okviru disertacije, može se zaključiti da hitozanski premaz minimalno utiče značajno da mehanizme biohemijskih reakcija koji definišu promenu vrednosti pH tokom skladištenja.

## Instrumentalno određivanje boje

Rezultati instrumentalnog određivanja boje Petrovačke kobasice prikazani su u *Tabeli 18*. Kada se analizira promena boje površine kobasica, ni kod jedne kobasice nije došlo do statistički značajne promene parametara boje ( $p > 0.05$ ). Isti rezultati su dobijeni i u prethodna dva eksperimenta. Poredeći boju površine kontrolne kobasice sa i bez dodatka ASK, uočava se da je dodatkom ASK došlo do značajnog povećanja udela crvene i žute boje na kraju sušenja, ali se ove razlike tokom skladištenja ujednačavaju. Nanošenjem hitozanskog premaza na kobasice u prethodna dva eksperimenta, promena boje je uočena kao značajna samo za parametar  $L^*$ , dok su parametri  $a^*$  i  $b^*$  ostali nepromenjeni. Najverovatnije zbog dodatka voska u film, u ovom eksperimentu je došlo do promene, kako parametra  $L^*$ , tako i parametara  $a^*$  i  $b^*$ . Vrednost svetloće i udeo žute boje su značajno povećani, dok je udeo crvene boje smanjen u kobasicama sa hitozanskim premazom. Ova promena boje je bila i vizuelno uočljiva, tako da bi mogla uticati na prihvatljivost proizvoda od strane potrošača. U odnosu na mrkocrvenu, prijatnu i ujednačenu boju kontrolnih kobasica, boja kobasice sa hitozanskim premazom je slabije izražena i neujednačenija sa žućkastim tragovima osušenog premaza gde je došlo do nagomilavanja tokom sušenja i slivanja filmogene emulzije. Ovaj nedostatak bi možda bilo moguće ukloniti upotrebom jestivih boja u omotaču i optimizacijom postupka nanošenja premaza.

Vrednosti za svetloću preseka kontrolne kobasice i kontrolne kobasice ASK zadovoljavaju zahtev za kvalitet Petrovačke kobasice:  $L^* < 37$  (Petrović *i sar.*, 2007; Ikonić *i sar.*, 2010; Petrović *i sar.*, 2011; Škaljac, 2014), pri čemu kontrolna kobasica ASK ima višu vrednost ovog parametra. Srednje vrednosti svih merenih parametara boje preseka, za kontrolnu kobasicu i kontrolnu kobasicu ASK, tokom skladištenja opadaju, ali ove promene nisu statistički značajne, osim za svetloću ( $L^*$ ) kod kontrolne kobasice ASK. Nakon 30 dana skladištenja, došlo je do značajnog sniženja svetloće kontrolne kobasice ASK sa vrednosti  $34.07 \pm 3.13$ , na kraju sušenja na  $28.55 \pm 2.09$ , nakon 30 dana. U odnosu na dva prethodna eksperimenta, boja obe kontrolne kobasice je stabilnija. Kontrolna kobasica bez ASK je prva kobasica kod koje ne dolazi do promene parametara boje tokom skladištenja, dok kod kontrolne kobasice ASK, samo  $L^*$  se menja tokom skladištenja. Kobasice sa zaštitnim slojem hitozana nisu imale značajno različite srednje vrednosti parametara boje, u odnosu na odgovarajuće kontrolne kobasice ( $p > 0.05$ ). Iako postoje određene razlike u srednjim vrednostima parametara boje, može se reći da hitozanski premaz nije uticao na promenu boje preseka Petrovačke kobasice tokom skladištenja. Ovaj rezultat je različit u odnosu na prethodna dva eksperimenta, gde je hitozanski sloj uticao na očuvanje boje preseka tokom skladištenja. Međutim, kobasice iz ovog eksperimenta imaju najstabilniju boju preseka tokom skladištenja, te zaštitni efekat hitozanskog sloja nije mogao biti uočen.

**Tabela 18. Parametri boje: L\*, a\*, b\* spoljne površine i preseka u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja**

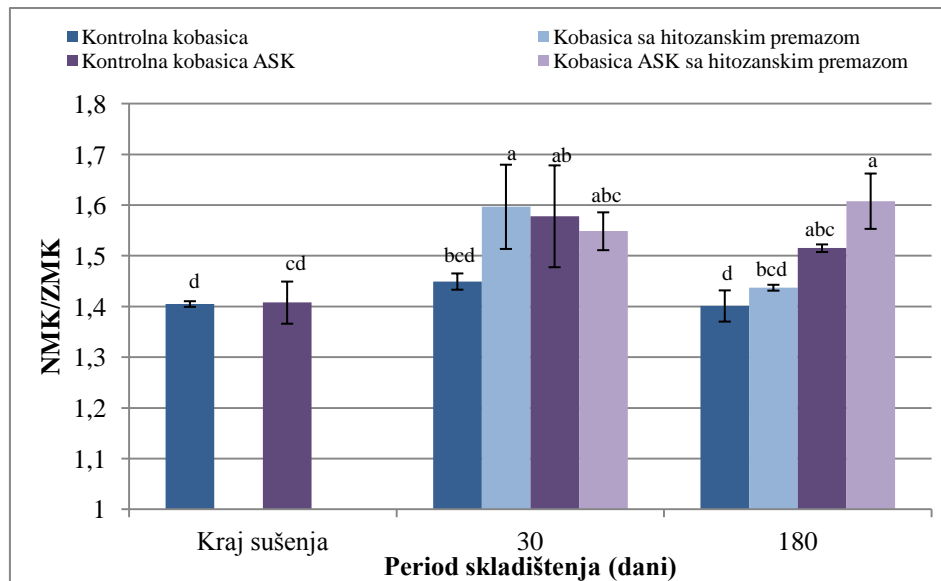
Period skladištenja (dani)	Kontrolna kobasica					
	presek			spoljna površina		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Kraj sušenja	29.60 <sup>bc</sup> ±2.2 1	21.79 <sup>ab</sup> ±1.45	15.83 <sup>abcd</sup> ±2.7 0	24.35 <sup>bcd</sup> ±3.2 1	4.54 <sup>bc</sup> ±3.10	2.98 <sup>c</sup> ±1.95
30	27.62 <sup>bc</sup> ±2.1 0	19.49 <sup>abc</sup> ±0.6 8	13.14 <sup>cd</sup> ±0.79	26.70 <sup>bcd</sup> ±7.9 2	5.82 <sup>abc</sup> ±2.0 2	3.80 <sup>bc</sup> ±1.28
180	26.35 <sup>c</sup> ±1.81	17.66 <sup>bc</sup> ±1.90	13.08 <sup>d</sup> ±2.30	23.16 <sup>cd</sup> ±0.97	6.93 <sup>ab</sup> ±2.10	5.24 <sup>b</sup> ±1.37
Period skladištenja (dani)	Kontrolna kobasica ASK					
	presek			spoljna površina		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Kraj sušenja	34.07 <sup>a</sup> ±3.13	22.82 <sup>a</sup> ±1.93	19.29 <sup>a</sup> ±3.31	21.38 <sup>d</sup> ±1.63	8.01 <sup>a</sup> ±0.39	5.44 <sup>b</sup> ±0.62
30	28.55 <sup>bc</sup> ±2.0 9	20.47 <sup>abc</sup> ±0.7 8	18.47 <sup>ab</sup> ±1.19	21.87 <sup>cd</sup> ±1.94	7.44 <sup>ab</sup> ±0.76	5.12 <sup>b</sup> ±0.51
180	27.98 <sup>bc</sup> ±1.8 0	19.76 <sup>abc</sup> ±2.8 4	16.99 <sup>abc</sup> ±2.76	24.47 <sup>bcd</sup> ±1.1 5	7.53 <sup>ab</sup> ±1.48	5.34 <sup>b</sup> ±1.09
Period skladištenja (dani)	Kobasica sa hitozanskim premazom					
	presek			spoljna površina		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
30	27.80 <sup>bc</sup> ±1.3 8	19.56 <sup>abc</sup> ±1.4 5	13.25 <sup>cd</sup> ±2.04	38.84 <sup>a</sup> ±4.94	3.25 <sup>c</sup> ±1.19	8.59 <sup>a</sup> ±2.28
180	27.40 <sup>bc</sup> ±2.4 1	17.39 <sup>c</sup> ±3.00	12.03 <sup>d</sup> ±2.51	30.83 <sup>b</sup> ±1.56	7.24 <sup>ab</sup> ±2.16	11.34 <sup>a</sup> ±1.3 3
Period skladištenja (dani)	Kobasica ASK sa hitozanskim premazom					
	presek			spoljna površina		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
30	30.29 <sup>ab</sup> ±3.7 1	18.84 <sup>bc</sup> ±1.20	16.91 <sup>abc</sup> ±2.63	41.32 <sup>a</sup> ±4.82	3.36 <sup>c</sup> ±1.23	9.00 <sup>a</sup> ±1.22
180	27.82 <sup>bc</sup> ±1.5 2	19.90 <sup>abc</sup> ±1.4 4	15.11 <sup>bcd</sup> ±1.66	28.48 <sup>bc</sup> ±1.84	5.69 <sup>abc</sup> ±1.2 4	10.22 <sup>a</sup> ±1.6 3
Period skladištenja (dani)	Kobasica vakuum					
	presek			spoljna površina		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
30	26.86	19.23	13.11	24.95	10.22	7.59
180	-	-	-	-	-	-
Period skladištenja (dani)	Kobasica ASK vakuum					
	presek			površina		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
30	30.12	19.70	18.18	27.76	8.15	5.65
180	-	-	-	-	-	-

Različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti u koloni (p<0.05)



## Masnokiselinski sastav

Na *Grafiku 35.* su prikazani rezultati odnosa između nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u ispitivanim kobasicama. Na kraju sušenja, odnos NMK/ZMK je isti u kontrolnoj kobasici i kontrolnoj kobasici ASK. U kontrolnoj kobasici se ovaj odnos nije značajno menjao tokom skladištenja ( $p > 0.05$ ), ali je zapažen jedan numerički porast nakon 30 dana skladištenja. Kod kobasice zaštićene hitozanskim premazom, ovaj porast, koji je kod kontrolne kobasice bio na nivou numeričkog, je statistički značajan ( $p < 0.05$ ). Ova razlika u odnosu NMK/ZMK, uočena nakon 30 dana skladištenja, nestaje na kraju skladištenja od 180 dana i odnos NMK/ZMK je na kraju skladištenja sličan ( $p > 0.05$ ). Kobasica sa hitozanskim premazom ima, tokom čitavog perioda skladištenja, više vrednosti odnosa NMK/ZMK, samo što je ova razlika nakon 30 dana i statistički značajna. Za razliku od kontrolne kobasice, kod kontrolne kobasice ASK dolazi do statistički značajnog porasta odnosa NMK/ZMK nakon 30 dana skladištenja, a zatim do blagog pada. Kada je na kobasicu ASK nanesen premaz na bazi hitozana, trend promene odnosa NMK/ZMK je drugačiji. Nakon porasta vrednosti NMK/ZMK nakon 30 dana skladištenja, ova vrednost i dalje numerički raste do 180. dana, za razliku od kontrolne kobasice ASK. Ipak, statistički, razlike u vrednostima NMK/ZMK u kontrolnoj kobasici ASK i kobasici ASK sa hitozanskim premazom nisu bile značajne tokom skladištenja ( $p > 0.05$ ). U odnosu na prethodna dva eksperimenta, rezultati su slični rezultatima sa hitozanskim omotačem sa EUK, gde je takođe jedina statistički značajno veća vrednost odnosa NMK/ZMK u kobasici sa hitozanom u odnosu na kontrolnu kobasicu uočena nakon 30 dana skladištenja, dok je na kraju skladištenja razlika bila samo numerička. U eksperimentu sa EUO u hitozanskom premazu, iako je odnos NMK/ZMK bio veći numerički tokom čitavog perioda skladištenja, u kobasici sa hitozanskim omotačem, razlike nisu bile statistički značajne. Poseban značaj ima očuvanje polinezasićenih masnih kiselina, od kojih u većoj meri potiču uočene razlike.

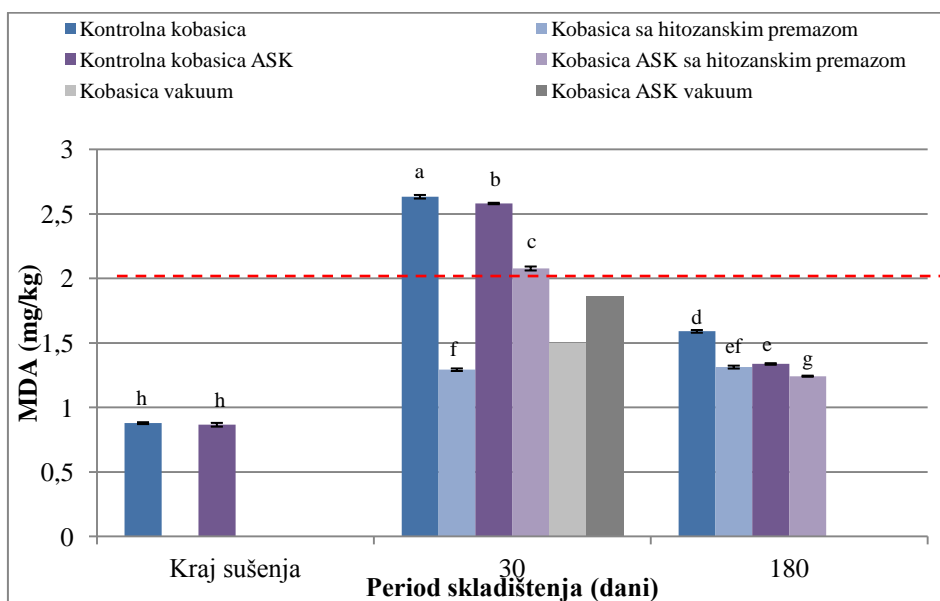


**Grafik 35.** Odnos sadržaja nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka ASK stoji uz kobasicu sa autohtonom starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

### Sadržaj malondialdehida (TBARS test)

Malondialdehid (MDA) nastaje iz hidroperoksida formiranih u toku oksidacije polinezasićenih masnih kiselina i najčešće je korišćeni indikator lipidne peroksidacije, ali i značajan pokazatelj kvaliteta mesa i proizvoda od mesa. Sadržaj malondialdehida, prikazan na Grafiku 36., u obe kontrolne kobasice je bio sličan na kraju procesa sušenja ( $p < 0.05$ ) i iznosio je  $0.88 \pm 0.01$  mg/kg za kontrolnu kobasicu i  $0.87 \pm 0.01$  mg/kg za kontrolnu kobasicu ASK. Tokom skladištenja je došlo do značajnog skoka u sadržaju MDA u kontrolnim kobasicama, tako da je već nakon 30 dana skladištenja sadržaj bio preko 2.5 mg/kg. Na kraju perioda skladištenja je došlo do opadanja sadržaja MDA u obe kontrolne kobasice, što je najverovatnije, kako je već objašnjeno posledica interakcije ovog jedinjenja sa razgradnim produktima nastalim u toku procesa zrenja, kao što su aminokiseline, šećeri i nitriti (Janero, 1990; Ansorena i Astiasaran, 2004; Šojić *i sar.*, 2014). Kada su kobasice premazane hitozanskim slojem, sadržaj MDA je za obe kobasice bio značajno snižen tokom čitavog perioda skladištenja ( $p < 0.05$ ). Kod kobasice sa hitozanskim premazom je zaštitno svojstvo hitozanskog premaza dokazano u velikoj meri. Tokom šest meseci skladištenja, kobasica sa hitozanskim premazom je imala sadržaj MDA ispod 1.5 mg/kg, što je ispod granice užegnuća, koja iznosi 2 mg/kg. Kada se posmatra kobasica ASK sa hitozanskim premazom, efekat premaza je takođe izražen, ali nešto manjeg intenziteta u odnosu na efekat zapažen kod druge kobasice. Naime, nakon 30 dana skladištenja je vrednost MDA u kobasici ASK sa hitozanskim premazom dostigla granicu užegnuća za suve fermentisane kobasice i iznosila je  $2.08 \pm 0.02$  mg/kg. Ipak, ova vrednost je značajno manja ( $p < 0.05$ ) u odnosu na vrednost sadržaja MDA za kobasicu bez premaza koja je iznosila  $2.58 \pm 0.01$  mg/kg. Ovi rezultati su slični rezultatima koji su

dobijeni u eksperimentu sa EUO, dok je u eksperimentu sa EUK zaštitni efekat premaza u oksidaciji kobasice bio daleko manje izražen.



**Grafik 36.** Sadržaj malondialdehida (mg/kg) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka ASK stoji uz kobasicu sa autohtonom starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d, e, f, g, h označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

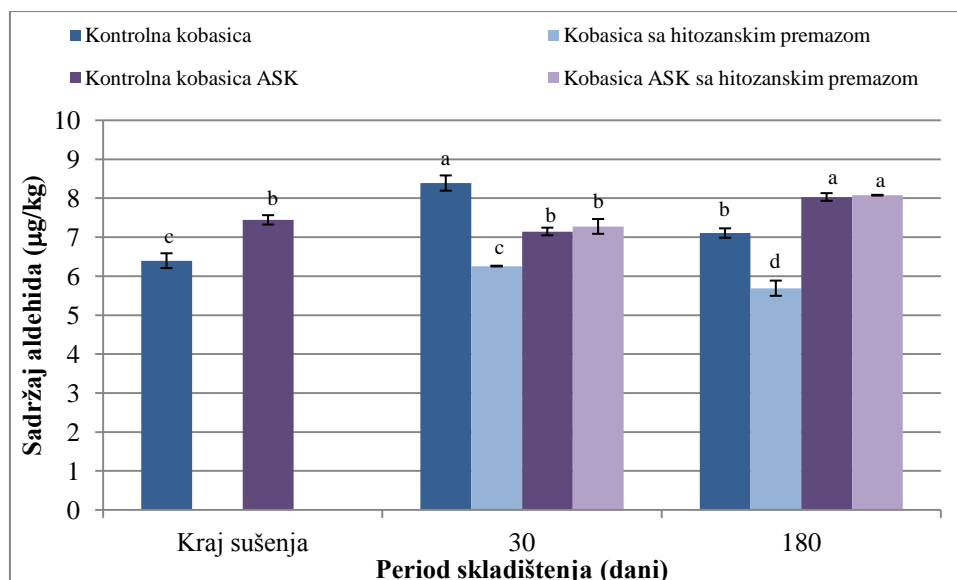
Uopšteno, osnovni mehanizam usporavanja oksidativnih promena u kobasicama je odstranjivanje kiseonika, dok ostali mehanizmi mogu biti zasnovani na inhibiciji delovanja prooksidanata u mesu (posebno jona gvožđa), inaktivaciji enzima lipooksigenaza ili hvatanje i stabilizacija slobodnih radikala (Šojić, 2013). Svi navedeni mehanizmi su aktuelni u upotrebi premaza na bazi hitozana sa dodatkom EUK i pčelinjeg voska. Ukoliko se uporedi intenzitet delovanja premaza sa pakovanjem kobasica u vakuumu, može se zaključiti da je nakon 30 dana skladištenja intenzitet usporavanja nastanka MDA srazmeran intenzitetu uočenom kod kobasica u vakuumu. Najverovatnije je dobra barijera premaza za gasove razlog ovako izraženog zaštitnog delovanja. Sa druge strane, dobra barijera za gasove pretpostavlja formiranje kontinuirane prevlake, što bi bilo u suprotnosti sa hipotezom koja je izneta, da je razlog lošeg efekta premaza u očuvanju sadržaja vlage pojava napuklina u filmu. Ukoliko bi se pretpostavilo da zaštita od oksidacije koja je zapažena kod kobasica sa hitozanskim premazom, potiče od drugih mehanizama usporavanja (heliranje slobodnog gvožđa, hvatanje slobodnih radikala i inaktivacija enzima), za koje su zaslužni hitozan i EUK u filmu i onaj deo EUK koji je difundovao u masu kobasice, a imajući u vidu rezultate iz prethodnog eksperimenta, jedina preostala pretpostavka je da je aktivnost filma u ovom eksperimentu povezana sa prisutnim pčelinjim voskom. Iako je pokazao određeni doprinos u antioksidativnoj aktivnosti, ipak je njegov doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti skromnija od EUK. Na osnovu iznetog, nameće se da je verovatnije da je smanjeni sadržaj MDA u kobasici sa hitozanskim premazom posledica dobrih barijernih svojstava hitozanskog

biofilma za gasove, u kombinaciji sa efektom EUK, a da smanjeni sadržaj vlage u ovoj kobasici nije posledica napuklina u premazu, već nedovoljne postignute barijere za vlagu. Da bi se ovaj nedostatak uklonio, u literaturi je predloženo nekoliko modela: intenzivnije mešanje, veći sadržaj lipidne frakcije u premazu, tretiranje toplotom nakon nanošenja premaza, dodatak plastifikatora, optimizacija postupka nanošenja premaza (Tyburcy i Kozyra, 2010; Tyburcy *i sar.*, 2010; Perez-Gago i Krochta, 2001, McHugh i Krochta, 2004; Navarro-Tarazaga *i sar.*, 2011). Najverovatniji razlog zašto je u drugoj godini došlo do slabijeg efekta zaštite kobasice od oksidacije je zato što je došlo do narušavanja kompaktnosti premaza, a efekat koji je uočen, najverovatnije potiče od antioksidativnog delovanja EUK. Moguće je da je došlo do izlaganje atmosferi sa većim sadržajem vlage, koja bi dovela do bubrenja i povećanja propustljivosti filma, manipulativnog oštećenja ili greške u nanošenju premaza koji nije potpuno prekrrio kobasicu. U literaturi se, takođe, sreću kontradiktorni podaci o uticaju hitozanskog premaza na oksidativne promene u različitim vrstama hrane. U radovima Hammond (2004) i Chhabra (2004), hitozanski omotač nije uticao na oksidativne promene ribe som skladištene smrznute ili u uslovima frižidera, tokom 13 dana, kao ni ostriga skladištenih 15 dana na 4°C, dok je u većem broju radova efekat hitozanskog premaza bio izražen (Siripatavan i Noipa, 2012; Schreiber *i sar.*, 2013; Jeon *i sar.*, 2002; Xiufang i Baohua, 2008).

### Sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida

Sadržaj zasićenih alifatičnih aldehida u ispitivanim kobasicama prikazan je na *Grafiku 37*. Sadržaj na kraju postupka sušenja je približan sadržaju aldehida u kobasici u prvom eksperimentu sa EUO, a značajno niži (oko 6 puta) u odnosu na sadržaj ukupnih zasićenih aldehida u drugoj godini, sa EUK. Slično kao u prethodnom eksperimentu, između kobasice sa i bez dodate ASK, uočena je značajna razlika u sadržaju aldehida na kraju procesa sušenja ( $p < 0.05$ ). Takođe, trend promene sadržaja ukupnih aldehida tokom skladištenja u dve kontrolne kobasice je različit. Kod kontrolne kobasice, sadržaj aldehida raste do 30. dana skladištenja, a zatim opada, najverovatnije kao posledica destrukcije nastalih aldehida ili zbog reakcije aldehida sa razgradnim produktima proteolize (Andrés *i sar.*, 2004, Qiu *i sar.*, 2013). Kod kontrolne kobasice ASK, nakon 30 dana skladištenja, nema promene u sadržaju aldehida, a porast je zabeležen na kraju skladištenja od 150 dana. Trend promene sadržaja aldehida je različit u odnosu na prethodni eksperiment sa premazom sa EUK, gde je kod kontrolne kobasice početni visok sadržaj aldehida ostao nepromenjen tokom skladištenja, a kod kontrolne kobasice SK visoka početna vrednost sadržaja aldehida se smanjivala tokom skladištenja. Sličnost se može uočiti sa trendom promene sume aldehida u prvom eksperimentu sa premazom sa EUO. Kod kontrolne kobasice sa hitozanskim premazom može se uočiti razlika u sadržaju ukupnih zasićenih aldehida, tokom čitavog perioda skladištenja ( $p < 0.05$ ). Naime, premazivanje kobasica zaštitnim hitozanskim premazom dovelo je do manjeg sadržaja ukupnih aldehida, tokom čitavog perioda skladištenja, koji nije prešao početnu vrednost na kraju sušenja. Rezultati su u skladu sa rezultatima prikazanim za sadržaj MDA, kao i sa prikazanim odnosom

NMK/ZMK. Sva tri parametra za praćenje oksidativnih promena u kontrolnoj kobasici ukazuju na to da je nanošenjem hitozanskog premaza sa EUK i pčelinjim voskom kobasica efikasno zaštićena od nepoželjnih oksidativnih promena tokom skladištenja od 6 meseci.



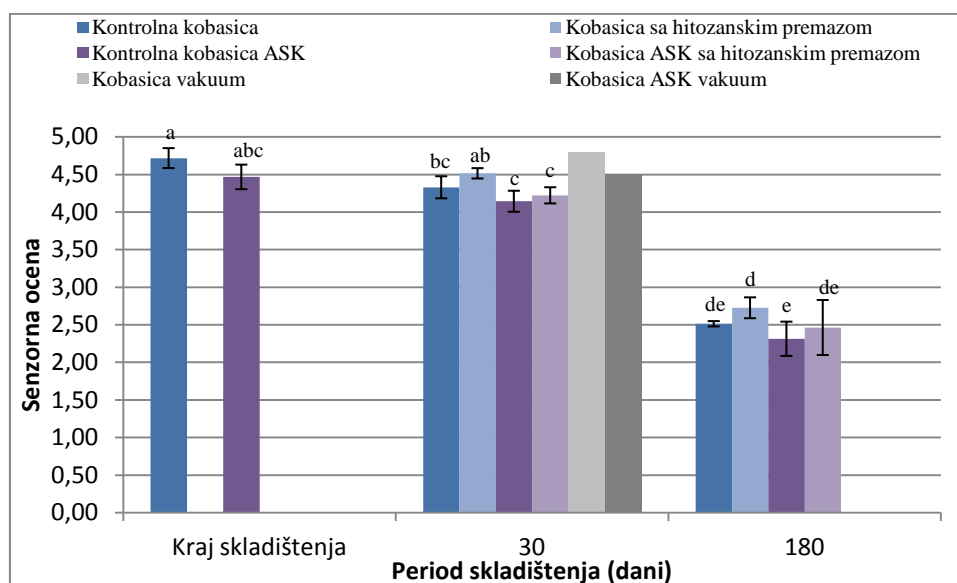
**Grafik 37.** Sadržaj ukupnih zasićenih alifatičnih aldehida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja, oznaka ASK stoji uz kobasicu sa autohtonom starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Kod kontrolne kobasice ASK i kobasice ASK sa hitozanskim premazom, nije zapažena razlika u sadržaju aldehida tokom perioda skladištenja. Moguće je da ovde nije uočen doprinos premaza zbog minimalne promene sadržaja aldehida tokom skladištenja kontrolne kobasice ASK tokom 6 meseci. Naime, na kraju sušenja je sadržaj aldehida bio ( $7.44 \pm 0.12$ ) mg/kg, a najveća vrednost sadržaja tokom skladištenja snimljena 180. dana skladištenja je bila ( $8.03 \pm 0.10$ ). Kada se sva tri ispitivana faktora oksidativnih promena uzmu u obzir, može se reći da je i kod kobasice ASK premaz na bazi hitozana, EUK i pčelinjeg voska doveo do zaštite od oksidativnih promena, u nešto manjoj meri nego kod kontrolne kobasice. Slično bi se moglo reći i za efekat premaza na bazi hitozana i EUO u prvom eksperimentu, dok efekat premaza na bazi hitozana i EUK u drugom eksperimentu nije dao jasan zaštitni efekat. Moguće je da je došlo do narušavanja integriteta hitozanskog filma, ili su oksidativne promene u kobasici već krenule intenzivno da se odvijaju (na osnovu sadržaja ukupnih aldehida) na kraju sušenja, pa premaz nanet na kobasicu u kojoj su oksidativne promene već nastale nije uspeo da ispolji svoj efekat.

### Senzorska analiza profila mirisa i ukusa

Senzorski profil mirisa i ukusa, važna ocena senzorskog kvaliteta za ispitivane kobasice je prikazan na *Grafiku 38*. Između kontrolne kobasice i kontrolne kobasice ASK nije bilo razlike u senzorskom profilu mirisa i ukusa, kako na kraju sušenja, tako ni tokom

čitavog perioda skladištenja ( $p > 0.05$ ). Numerički je kobasica bez dodate ASK bila nešto bolje ocenjena u svim tačkama, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Ocena senzorskog profila mirisa i ukusa kontrolnih kobasica se kretala od oko 4.5 na kraju sušenja, između 4 i 4.5 nakon 30 dana skladištenja do između 2 i 2.5 na kraju perioda skladištenja od 180 dana. Hitozanski premaz je minimalno uticao na profil mirisa i ukusa ispitivanih kobasica. Numerički su ocene mirisa i ukusa za kobasice za premazom bile više, u obe ispitivane tačke, od ocena za odgovarajuće kontrolne kobasice, ali ni u jednom momentu ova razlika nije verifikovana kao statistički značajna ( $p > 0.05$ ). U prethodna dva eksperimenta je uticaj hitozanskog premaza na senzorski profil mirisa i ukusa bio uočljiviji. Naime, u prethodnom eksperimentu sa premazom sa EUK zaštitni uticaj premaza na senzorska svojstva je bio vidljiv nakon 60 dana skladištenja, a do 150. dana više nije.



**Grafik 38.** Senzorna ocena mirisa i ukusa Petrovačke kobasice tokom skladištenja, oznaka ASK stoji uz kobasicu sa autohtonom starter kulturom. Vertikalne linije označavaju standardnu devijaciju a različita slova a, b, c, d, e označavaju statistički značajno različite vrednosti ( $p < 0.05$ ).

Efikasnost uticaja premaza je prestala negde između ove dve tačke. U prvom eksperimentu je premaz sa EUO održao senzorsku ocenu na 4 do 150. dana skladištenja. Između prethodna dva eksperimenta se može povući paralela da hitozanski premaz pokazuje zaštitni efekat prema senzorskom profilu mirisa i ukusa do blizu 5 meseci skladištenja ili nešto kraće. Moguće je da u ovom eksperimentu, obzirom da su kontrolne tačke bile nakon 1 meseca i nakon 6 meseci skladištenja, efekat hitozanskog premaza nije uočen i da bi možda bio uočen da je postojala kontrolna tačka između dve navedene kontrolne tačke.

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru teze je prikazan razvoj aktivnog prirodnog jestivog premaza za primenu na proizvode od mesa u tipu fermentisanih suvih kobasica, nakon sušenja. Premaz je izrađen na bazi visokoviskoznog hitozana, a optimizovan dodatkom prirodnih aktivnih komponenti, etarskog ulja origana i kima, kao i pčelinjeg voska u cilju zaštite suve fermentisane kobasice od nepoželjnih promena, kao što su: gubitak vlage, promena boje, oksidacija i senzorska degradacija. Na osnovu izvršenih istraživanja, obrađenih i prodiskutovanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Od hitozana niskog, srednjeg i visokog viskoziteta moguće je formirati filmove koji su sjajni, prozirni, ujednačenih debljina, jaki, fleksibilni i šuščaju na dodir, bez vidljivih nedostataka, sa mirisom „na sirće“. Između filmova proizvedenih od hitozana različitih viskoziteta nije uočena vizuelna razlika. Tokom formiranja filma došlo je do promena u strukturi hitozana, pri čemu je hitozan iz nativnog oblika prešao u so, hitozonijum acetat. U strukturi filmova od hitozana različitih viskoziteta uočena je razlika koja upućuje na veći broj  $-CH_2$  veza u strukturi visokoviskoznog hitozana, kao i na veći broj intra i intermolekularnih vodoničnih veza. Poređenjem mehaničkih i barijernih svojstava za vodenu paru filmova na bazi hitozana različitog viskoziteta, sa i bez dodatka polietilenoksida, uočeno je da hitozan visokog viskoziteta daje filmove najboljih mehaničkih svojstava, dok po barijernim svojstvima filmovi sa dodatkom polietilenoksida imaju nešto bolja svojstva.
2. Sa dodatkom etarskog ulja origana, kod hitozanskih filmova, kao i kolagen-hitozan laminiranih omotača miris na sirće je zamenjen slabo do srednje izraženim mirisom na origano. Sa dodatkom rastuće koncentracije ulja, debljina filmova raste linearno, dok debljina laminiranih omotača takođe raste, ali nešto nepravilnijim trendom. Sa dodatkom etarskog ulja origana, linearno se smanjuje zatezna jačina filmova, dok se zatezna jačina laminiranih omotača smanjuje nepravilnijim trendom i u manjoj meri. Promena izduženja pri kidanju za filmove sa uljem je minimalna, dok kod laminiranih omotača nije bilo promene ovog parametra. Rezultati ispitivanja fizičko-hemijskih svojstava filmova i laminiranih omotača sa etarskim uljem origana su pokazali da je dodatak ulja značajno uticao samo na smanjenje sposobnosti bubrenja biofilma, dok je sposobnost bubrenja laminiranog omotača ostala nepromenjena. Sadržaj vlage i rastvorljivost biofilmova, kao i laminiranih omotača se nisu promenili sa dodatkom ulja. Sa dodatkom etarskog ulja, došlo je do promene svih parametara boje biofilma. Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ ) je postepeno rasla sa dodatkom veće koncentracije etarskog ulja origana. Ova promena je golim okom uočena kao smanjenje transparentnosti hitozanskog filma koji je postao mlečan, opalescentan, beličasto-žućkast. Ovakva promena boje filma je nepoželjna sa stanovišta upotrebe jer mutan, beličasto-žućkast film može uticati na promenu percepcije boje upakovanog proizvoda. Laminacijom kolagenog filma došlo je do promene vrednosti parametara boje, ali je ova promena daleko manje izražena nego u slučaju biofilmova. Promene boje izazvane laminacijom kolagenog omotača nisu detektovane golim okom. Sa dodatkom etarskog ulja nije

došlo do promene brzine propustljivosti vodene pare hitozanskih biofilmova, dok je kod laminiranih kolagenih omotača uočeno slabo smanjenje ove vrednosti. Filmovi i laminirani omotači sa i bez etarskog ulja su imali podjednake vrednosti propustljivosti za gasove. Struktura hitozanskog filma određena ATR-FTIR spektrometrijom je izmenjena dodatkom etarskog ulja pojavom novih pikova i promenom postojećih. Na SEM snimcima površine laminiranog omotača je uočeno da hitozanski sloj kontinualno prekriva površinu kolagenske baze, a uočene su i neravnine omotača, dok je na preseku uočena višeslojna struktura.

3. Premaz na bazi hitozana sa 0.2% (v/v) etarskog ulja origana nije bio efikasan u zaštiti Petrovačke kobasice od gubitka vlage. Promena vrednosti pH u kobasici sa hitozanskim premazom je nešto brža i izraženija u odnosu na kontrolnu kobasicu. Kobasica sa hitozanskim premazom je imala veću vrednost svetloće površine i stabilniju boju preseka tokom skladištenja u odnosu na kontrolnu kobasicu. Odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina tokom skladištenja se nije razlikovao između kontrolne i kobasice zaštićene slojem hitozana ( $p > 0.05$ ). Zaštitni premaz hitozana sa etarskim uljem origana je pokazao izražen efekat u smanjenju intenziteta oksidacije lipida tokom svih 7 meseci skladištenja. Kobasica sa hitozanom i uljem je imala nizak sadržaj MDA i bila u zoni ispod granice užegnuća za fermentisane suve kobasice, za razliku od kontrolne kobasice. Takođe, na kraju perioda skladištenja, kobasica sa hitozanskim premazom je imala značajno niže vrednosti sadržaja ukupnih aldehida u odnosu na kontrolnu kobasicu. Prisustvo hitozanskog omotača sa etarskim uljem nije negativno uticalo na senzorsku ocenu Petrovačke kobasice, iako su panelisti primetili prisustvo stranog mirisa i ukusa na origano. Sa druge strane, hitozanski premaz sa etarskim uljem je imao izražen pozitivan uticaj na očuvanje senzorskih svojstava mirisa i ukusa Petrovačke kobasice tokom skladištenja do 150-og dana.
4. Hitozanski biofilm sa 0.8% (v/v) etarskog ulja kima je beličasto-žućkast, mutan, slabo proziran, mek, sa mirisom na kim. U odnosu na film sa istim sadržajem etarskim uljem origana, film je kompaktniji, nema tragova ulja na površini. Boja laminiranog kolagenog omotača u odnosu na nelaminirani omotač je nešto tamnija, materijal je ravan, gladak, mek, sa blagim, prijatnim mirisom na kim. Na omotaču su uočeni vizuelni nedostaci: neravnomerna „prošaranost“ sjajnim i mat površinama, kao i beli kružni tragovi. U odnosu na film i laminirani omotač korišćen u prethodnom eksperimentu sa 0.2% etarskog ulja origana, dobijeni film i laminirani omotač sa 0.8% etarskog ulja kima je veće debljine, manje zatezne jačine (imajući u vidu zateznu jačinu biofilma), manje sposobnosti bubrenja i manje brzine propustljivosti vodene pare. Analizom strukture biofilma, uočena je pojava novog pika koji odgovara prisustvu aromatičnog prstena poreklom iz komponenata etarskog ulja kima.
5. Primena više koncentracije ulja u hitozanskom premazu, iako je dovela do smanjenja brzine propustljivosti vodene pare kroz laminirane omotače, u primeni nije dovela do značajne promene smanjenja sadržaja vlage u kobasici. Za razliku od kobasice premazane zaštitnim slojem hitozana sa etarskim uljem origana, premazivanje



zaštitnog sloja hitozana sa uljem kima nije dovelo do promene u vrednostima pH kobasice sa i bez starter kulture tokom skladištenja. Poređenjem boje površina kobasica sa hitozanskim premazom sa etarskim uljem kima u odnosu na premaz sa uljem origana, uočen je izraženiji porast svetloće površine i stabilnija boja površine kod premaza sa uljem kima. Analizom boje preseka kobasica sa zaštitnim premazom, uočeno je bolje očuvanje boje kod kobasice sa dodatkom starter kulturom, dok je kod kobasice bez starter kulture došlo čak do izraženije promene boje u odnosu na kontrolnu kobasicu. Premaz sa etarskim uljem kima je usporio degradaciju nezasićenih masnih kiselina u Petrovačkoj kobasici tokom skladištenja. Efekat hitozanskog premaza sa etarskim uljem kima na odlaganje oksidacija lipida kobasice, mereno sadržajem MDA, je uočljiv samo kod kobasice sa starter kulturom i, ukoliko se uporedi sa efektom hitozanskog premaza sa etarskim uljem origana, njegovo dejstvo je manje izraženo. Premazivanjem kobasice bez starter kulture hitozanskim slojem sa uljem kima došlo je do značajnog sniženja sadržaja aldehida tokom čitavog perioda skladištenja ( $p < 0.05$ ). Ovaj rezultat je sličan rezultatu koji je postignut primenom hitozanskog premaza sa uljem origana, dok kod kobasice sa starter kulturom ovaj zaštitni efekat nije registrovan. Rezultati instrumentalnih ispitivanja su potvrđeni i senzorskom ocenom mirisa i ukusa. Kod kobasice bez dodate starter kulture hitozanski premaz nije doneo poboljšanje mirisa i ukusa tokom skladištenja, dok je tokom čitavog perioda skladištenja ocena za kobasicu sa starter kulturom sa premazom bila viša u odnosu na kontrolnu kobasicu.

6. Povećanje koncentracije hitozana u filmogenom rastvoru sa 0.4% (w/v) na 0.8% (w/v) je dovelo do promene većine ispitivanih svojstava. Sva ispitivana mehanička svojstva, debljina, zatezna jačina i izduženje pri kidanju filma su, za istu masu filmogenog rastvora, bila veća kod filma sa većom koncentracijom hitozana ( $p < 0.05$ ). Na osnovu rezultata ispitivanja fizičko-hemijskih svojstva koja ukazuju na osetljivost analiziranih filmova na vlagu, u ispitivanom opsegu, koncentracija hitozana u filmogenom rastvoru ima značajnu ulogu u smanjenju osetljivosti filma na dejstvo vlage ( $p < 0.05$ ). Analiziranjem barijernih svojstava za gasove i vodenu paru, može se videti da je kod barijernih svojstava za gasove došlo do numeričke promene vrednosti, koja nije bila statistički značajna ( $p > 0.05$ ), dok je barijera za vodenu paru značajno poboljšana ( $p < 0.05$ ).
7. Sa dodatkom rastuće koncentracije pčelinjeg voska, promenjen je izgled hitozanskog biofilma, kao i kolagen-hitozan laminiranog omotača. Sa dodatkom voska, debljina hitozanskih filmova i kolagen-hitozan laminiranih omotača linearno raste, a vrednosti zatezne jačine i izduženja pri kidanju opadaju. Sa porastom koncentracije voska u filmu, opada sadržaj vlage pri svim ispitivanim RH vrednostima. Najveća sposobnost bubrenja filma je snimljena u dejonizovanoj vodi, a najmanja u puferu pH 9. Razlike u sposobnosti bubrenja u zavisnosti od vrednosti pH su najizraženije za hitozanski film bez lipidne komponente, dok sa dodatkom etarskog ulja, a posebno sa dodatkom pčelinjeg voska vrednosti za sposobnost bubrenja u različitim puferima se izjednačuju. Sa dodatkom voska u film, sposobnost bubrenja u odnosu na film sa etarskim uljem

kima opada linearno, a u odnosu na hitozanski film bez ulja eksponencijalno. Slično kao kod bubrenja, dodatkom pčelinjeg voska došlo je do sniženja rastvorljivosti hitozanskog filma, ali je smanjenje rastvorljivosti manje izraženo. Kada je u film, odnosno sloj laminata, dodat pčelinji vosak, došlo je do sniženja brzine propustljivosti vodene pare. Dodatkom pčelinjeg voska u filmogenu emulziju, došlo je do povećanja propustljivosti za kiseonik i azot laminiranih kolagenih omotača, ali u uslovima eksperimenta ova promena nije bila statistički značajna. Između omotača sa različitom koncentracijom voska nije bilo razlike u propustljivosti za gasove. Varijacije vrednosti propustljivosti omotača za gasove su bile izuzetno visoke, što govori o neujednačenosti sloja laminata od kojeg ovo barijerno svojstvo zavisi. Sa povećanjem koncentracije voska u filmu svi karakteristični pikovi hitozanskog ATR-FTIR spektra se smanjuju, a novonastali pikovi koji vode poreklo iz voska postaju izraženiji. Ni kod jednog proizvedenog filma nije uočena razlika u spektru između gornje i donje površine filma. Poredeći rezultate dobijene za dodatak etarskih ulja kima i origana, može se reći da su oba ulja izuzetno doprinela antioksidativnoj aktivnosti hitozanskog filma. Za efikasnu formulaciju antioksidativnog omotača, koncentracija od 0.8% (w/v) etarskog ulja kima je dovoljna, dok je kod etarskog ulja origana moguće koristiti nižu koncentraciju. Uočena je i blaga antioksidativna aktivnost pčelinjeg voska. Poredeći rezultate antioksidativne aktivnosti filmova odmah nakon sušenja i nakon 30 dana stajanja ne uočava se značajna razlika ( $p > 0.05$ ). Analizom antimikrobne aktivnosti hitozanskog filma, sam hitozanski film je ispoljio značajno antimikrobno dejstvo u odnosu na bakterije *E.coli* i *S.aureus*, za razliku od *S.Typhimurium* i *L.monocytogenes*. Aktivnost hitozanskog filma prema *E.coli* zavisi od vremena inkubacije, dok je aktivnost prema *S.aureus* bila nezavisna od vremena inkubacije i puna aktivnost je ispoljena nakon 5 minuta. Etarska ulja origana i kima su se pokazala kao efikasni antimikrobni agensi. Dodatkom veće koncentracije voska u film dolazi do povećanja antimikrobne aktivnosti filma.

8. Hitozanski premaz sa etarskim uljem kima i pčelinjim voskom nije imao efekta u očuvanju sadržaja vlage u kontrolnoj kobasici tokom skladištenja. Nanošenjem ovog premaza nije došlo do promene vrednosti pH niti boje preseka Petrovačke kobasice tokom skladištenja, dok je su svi parametri boje površine kobasice bili izmenjeni. Ova promena boje površine je bila i vizuelno uočljiva, tako da bi mogla uticati na prihvatljivost proizvoda od strane potrošača. Primena hitozanskog premaza sa uljem kima i pčelinjim voskom je minimalno doprinela očuvanju polinezasićenih masnih kiselina u kobasicama tokom skladištenja. Kod kobasice sa hitozanskim premazom je zaštitno svojstvo hitozanskog premaza od oksidacije dokazano u velikoj meri, kroz niži sadržaj MDA i niži sadržaj ukupnih aldehida. Hitozanski premaz je minimalno uticao na profil mirisa i ukusa ispitivanih kobasica tokom skladištenja.

Generalno se može zaključiti da je cilj doktorske disertacije ispunjen jer je sintetisan aktivan jestivi premaz na bazi hitozana optimizovanih barijernih, fizičko-hemijskih, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava. Sintetisani premaz ima manju brzinu propustljivosti vodene pare, uz očuvanu nisku propustljivost za gasove, smanjenu osetljivost

na delovanje vlage i izraženiju antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Upkos optimizovanim barijernim svojstvima za vodenu paru, hitozanski premaz sa dodatkom etarskih ulja i/ili pčelinjeg voska nije imao efekta u očuvanju sadržaja vlage suve fermentisane kobasice tokom skladištenja. Ispitivani premazi su doprineli očuvanju boje preseka kobasice, ali ovaj efekat nije bio potpuno izražen kod svih tipova kobasice i svih premaza. Sva tri parametra za praćenje oksidativnih promena u kobasici ukazuju na to da je nanošenjem hitozanskog premaza sa etarskim uljem origana ili kima i pčelinjim voskom, kobasica efikasno zaštićena od nepoželjnih oksidativnih promena. Između eksperimenata se može povući paralela, da hitozanski premaz pokazuje zaštitni efekat prema senzorskom profilu mirisa i ukusa, do blizu 5 meseci skladištenja. Na ovom nivou razvoja premaza, on se može preporučiti kao pomoćan ambalažni materijal.

## 6. LITERATURA

1. Aggarwal, K.K., Khanuja, S.P.S., Ahmad, A., Kumar, T.R.S., Gupta, V.K., Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour Fragrance Journal*, 17 (1), 59–63.
2. Ahvenainen, R. (2003). Novel Food Packaging Techniques. VTT Biotechnology, Finland.
3. Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H., Abdollahi, M. (2014). Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control*, 36, 1-7
4. Alexandrova, V.A., Obukhova, G.V., Domnina, N.S., Topchiev, D.A. (1999). Modification of chitosan for construction of efficient antioxidant biodegradable macromolecular systems. *Macromolecular symposya*, 144, 413-422.
5. Almeida-Doria, R.F., Regitano-Dárce, M. (2000). Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Food Science and Technology (Campinas)*, 20(2), 197-203.
6. Altiok, D., Altiok, E., Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 2227–2236.
7. Al-Waili, N.S. (2005). Mixture of Honey, Beeswax and Olive Oil Inhibits Growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Arch. Med. Res*, 36, 10-13.
8. Amankwaah, C. (2013). Incorporation of selected plant extracts into edible chitosan films and the effect on the antiviral, antibacterial and mechanical properties of the material. PhD dissertation, The Ohio State University, OH, USA.
9. Andrés, A., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., Ruiz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry*, 84, 375–381.
10. Anilakumar, K.R. i Khanum, F. (2009). Effect of bees wax polyphenols on hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in rat liver. *International Journal of Integrative Biology*, 7 (3), 156-159.
11. Anker, M. (2000). Edible and Biodegradable Whey Protein Films as Barriers in Foods and Food Packaging. PhD Thesis, Chalmers University of Technology, Department of Food Science, Gothenburg, Sweden.
12. Anraku, M., Fujii, T., Kondo, Y., Kojima, E., Hata, T., Tabuchi, N., Tsuchiya, D., Goromaru, T., Tsutsumi, H., Kadowaki, D., Maruyama, T., Otagiri, M., Tomida, H. (2011). Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. *Carbohydrate Polymers*, 83, 501–505.

13. Ansorena, D., Astiasarán, I. (2004). Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. *Meat Science*, 67, 237–244.
14. Antioxidant Activity of Caraway Phenolic Extract [http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/27678/9/09\\_chapter%203.pdf](http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/27678/9/09_chapter%203.pdf)
15. Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez J. J., Calderón-Domínguez, G., Terres-Rojas, E., Garibay-Febles, V., Martínez-Rivas, A., Gutiérrez-López, G. F. (2012). Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers* 87, 289–299.
16. ASTM standard D882-10 (2010). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. ASTM international, Pennsylvania.
17. ASTM standard E2149-01 (2001). Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions. ASTM international, Pennsylvania.
18. Atarés, L., Bonilla, J., Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100, 678-687.
19. Averbach, B.L. (1978). Film-forming capability of chitosan. In: Proceedings of the First International conference on Chitin/Chitosan, Muzzarelli, R.A.A., Pariser, E.R. (eds.). Massachusetts Institute of Technology, MA, USA, 199-209.
20. Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M.G., Camacho-Dávila A., Torres-Muñoz, J. V., Nevárez-Moorillón, G.V. (2010). Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with Antioxidant and Antimicrobial Activity, *Food and Bioprocess Technology*, 3, 434–440.
21. Ayrançi, E., i Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423-431.
22. Azeredo, H., Mattoso, L.H., Wood, D., Williams, T., Avena-Bustillos, R., Mchugh, T. (2009). Nanocomposite Edible Films from Mango Puree Reinforced with Cellulose Nanofibers. *Journal of Food Science*, 74 (5), N31-N35.
23. Babović, N. (2010). Antioksidativne osobine frakcija dobijenih iz odabranih biljaka familije lamiaceae postupkom natkritične ekstrakcije. Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
24. Bailer, J., Aichinger, T., Hackl, G., de Hueber, K., Dachler, M. (2001). Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. *Industrial Crops and Products*, 14, 229–239.
25. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-75.

26. Bamdad, F., Goli, A.H., Kadivar, M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*) Edible film from lentil (*Lens culinaris*). *Food Research International*, 39, 106–111.
27. Baniyas, C., Oreopoulou, V., Thomopoulos C. D. (1992). The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69 (6), 520-524.
28. Ben, A., Kurth, L.B. (1995). Edible Film Coatings for Meat Cuts and Primals. Proceedings of the Australian Meat Industry Research Conference: CSIRO Meat Industry Research Conference, 10-12 September 1995, Queensland, Australia, 13-16.
29. Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J.E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the cross linking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110, 232–239.
30. Bergera J, Reista M, Mayera JM, Felth O, Peppasc NA, Gurnyb R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 19-34.
31. Bertuzzi, M. A., Vidaurre, E. F. C., Armada, M., Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films, *Journal of Food Engineering* 80, 972-978.
32. Bertuzzi, M.A., Gottifredi, J.C., Armada, M. (2012). Mechanical properties of a high amylose content corn starch based film, gelatinized at low temperature. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15 (3), 219-227.
33. Beverly, R.L., Janes, M.E., Prinyawiwatkul, W., No, H.K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25 (3), 534-537.
34. Bigi, A., Panzavolta, S., Rubini, K. (2004). Relationship between triplehelix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675–5680.
35. Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2012) Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids* 26, 9-16.
36. Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110, 208–213.
37. Bonina, P., Petrova, T., Manolova, N., Rashko, L. (2004). pH-sensitive hydrogels composed of chitosan and polyacrylamide: Enzymatic degradation. *Journal of Bioactive and Compatible Polymer*, 19,197-208.

38. Bosquez-Molina, E., Guerrero-Legarreta, I., Vernon-Carter, E.J. (2003). Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum–candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*, 36, 885–893.
39. Botstoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measur lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 1931–1937.
40. Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Cerqueira, M.A., Rocha, C.M.R., Avides, M.C., Quintas, M.A.C., Vicente, A.A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, 106, 111–118.
41. Bourtoom, T. i Chinnan, M.S. (2009). Improvement of Water Barrier Property of Rice Starch-chitosan Composite Film Incorporated with Lipids. *Food Science and Technology International*, 15 (2), 149-158.
42. Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. (1999). Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 95–104.
43. Bozkurt, H., Bayram, M. (2006). Colour and textural attributes of sucuk during ripening. *Meat Science*, 73, 344–350.
44. Bravin, B., Peressini, D. I Sensidoni, A. (2004). Influence of Emulsifier Type and Content on Functional Properties of Polysaccharide Lipid-Based Edible Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6448-6455.
45. Bravin, B., Perssini, D., Sensidoni, A. (2006). Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. *Journal of Food Engineering*, 76 (3), 280-290.
46. Brown, R. (2002). Handbook of Polymer Testing – Short-Term Mechanical Tests. Rapra Technology Limited, Shawbury, Shrewsbury, UK.
47. Butler, B.L., Vergano, P.J., Testin, R.F., Bunn, J.M., Wiles, J.L. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, 61 (5), 953-961.
48. Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 66, 865–870.
49. Cairns, P., Miles, M., Morris, V., Ridout, M., Brownsey, G. i Winter, W. (1992). X-ray fibre diffraction studies of chitosan and chitosan gels. *Carbohydrate Research*, 235, 23-28.

50. Camo, J., Lorés, A., Djenane, D., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2011). Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. *Meat Science*, 88, 174–178.
51. Campos, S.D., Alves, R., Mendes, E., Costa, A., Casal, S., Beatriz, M., Oliveira, M. (2013). Nutritional value and influence of the thermal processing on a traditional Portuguese fermented sausage (*alheira*). *Meat Science*, 93, 914–918.
52. Caner, C., Vergano, P.J., Wiles, J.L. (1998). Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science*, 63 (6), 1049-1053.
53. Casariego, A., Souza, B. W. S., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R. (2008). Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocolloids*, 22, 1452–1459.
54. Casariego, A., Souza, B.W.S., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R. (2007). Chitosan coating surface and permeation properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentration-application to vegetables. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> CIGR Section VI International Symposium on food and agricultural products: processing and innovations, Naples, Italy, 24-26 September 2007.
55. Cervera, M. F., Karjalainen, M., Airakisan, S., Rantanen, J., Krogars, K., Heinäimäki, J., Colarte, A.I., Yliruusi, J. (2004). Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films pasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 69–76.
56. Chamanara, V., Shabanpoura, B., Gorgina, S., Khomeirib, M. (2012). An investigation on characteristics of rainbow trout coated using chitosan assisted with thyme essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 540–544.
57. Chen, S. i Nussinovitch, A. (2001). Permeability and roughness determinations of wax-hydrocolloid coatings, and their limitations in determining citrus fruit overall quality. *Food Hydrocolloids*, 15, 127-137.
58. Cheng, L. H., Karim A. i Seow, C. C. (2008). Characterization of composite films made of konjac glucomannan (KGM), carboxymethyl cellulose (CMC) and lipid, *Food Chemistry*, 107, 411-418.
59. Chhabra, P. (2004). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan. M Sc Thesis, The University of Georgia, GA, USA.
60. Chi, S. (2004). Development and characterization of antimicrobial food coatings based on chitosan and essential oils. M Sc Thesis, The University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.
61. Chick, J., i Hernandez, R. J. (2002). Physical, thermal, and barrier characterization of casein-wax-based edible films. *Journal of Food Science*, 67, 1073-1079.



62. Choi, W.S. i Han, J.H. (2001). Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films. *Journal of Food Science*, 66, 319–322.
63. Chung, Y.C., Kuo, C.L., Chen, C.C. (2005). Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*, 96, 1473–1482.
64. Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., Deschamps, A. (2002). Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal Of Food Science*, 67, 1162-1169.
65. Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, 69, 381–392.
66. Coupland, J. N., Shaw, N. B., Monahan, F. J., O’Riordan, E. D., O’Sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43, 25-30.
67. Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*, Clarendon Press Oxford, UK
68. Cunningham, P., Ogale, A.A., Dawson, P.L., Acton, J.C. (2000). Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *Journal of Food Science* 65(4): 668–671.
69. Curaković, M., Vujković, I., Gvozdenović, J., Lazić, V. (1992). *Praktikum: Kontrola ambalažnih materijala i ambalaže, drugo dopunjeno i izmenjeno izdanje*, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
70. Cvijovic, M., Djukic, D., Mandic, L., Acamovic-Djokovic, G., Pesakovic, M. (2010). Composition and antimicrobial activity of essential oils of some medicinal and spice plants. *Chemistry of Natural Compounds*, 46 (3), 481-483.
71. Daisy, C. Q., Vivian, M. C., Yazmin, R. C., Rosa, M. F. (2013). Comparison of the protective effects of Omega 3 fatty acids and D- 002 (beeswax alcohols) on the ethanol-induced gastric ulcer in the rat - Comparación del efecto protector del Omega-3 y el D-002 (alcoholes de la cera de abejas) sobre la úlcera gástrica inducida por etanol en ratas. *Revista electrónica de Veterinaria*, 1695-7504.
72. Debeaufort, F. i Voilley, A. (2009). Lipid-based edible films and coatings. In: *Edible films and coatings for food application*, Embuscado, M.E. and Huber, K.C (eds.). Springer, New York, NY, USA, 135-168.
73. Debeaufort, F., Martin-Polo, M., Voilley, A. (1993). Polarity, homogeneity and structure affect water vapour permeability of model edible films. *Journal of Food Science*, 58 (2), 426-429.
74. Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Delporte, B., Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*, 180, 47–55.

75. Del Blanco, L.F., Rodriguez, M.S. Schulz, P.C. Agulló, E. (1999). Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties. *Colloid & Polymer Science*, 277 (11), 1087-1092.
76. Delaquis, P.J., Stanish, K., Girard, B., Mazza, G. (2002). Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.
77. Demarger-Andre, S., Domard, A. (1994). Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. *Carbohydrate Polymers*, 23 (3), 211–219.
78. Demeyer, D. (2004). Meat fermentation: Principles and applications. In: Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology, Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Hansen, A.S., Josephsen, J., Nip, W.-K., Stanfield, P.S., Toldrá, F. (eds.). Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA.
79. Descoursa E., Galic K., Voilley A., Debeaufort F. (2012). How composition and process parameters affect volatile active compounds in biopolymer films. *Carbohydrate Polymers*, 88, 646– 656.
80. Dhanapal, A., Sasikala., P, Rajamani, L., Kavitha., V, Yazhini, G., Shakila Banu, M. (2012) Edible films from polysaccharides. *Food Science and Quality Management*, 4, 9-17.
81. Dhanikula, A. B., Panchagnula, R. (2004). Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *The AAPS Journal*, 6, 1–12.
82. Di Cagno, R., Cháves López, C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., Hammes, W., Gobbetti, M. (2008). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science*, 79, 224–235.
83. Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P., Porta, R. (2006). Chitosan-Whey Protein Edible Films Produced in the Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. *Biomacromolecules*, 7, 744-749.
84. Dilamian M., Montazer M., Masoumi J. (2013). Antimicrobial electrospun membranes of chitosan/poly (ethylene oxide) incorporating poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride, *Carbohydrate Polymers*, 94, 364– 371.
85. Dimić, G., Kocić-Tanackov, S., Pejin, D., Pejin, J., Tanackov, I., Tuco, D. (2009). Antimicrobial activity of caraway, garlic and oregano extracts against filamentous moulds. *Acta Periodica Technologica*, 40, 9-16.
86. DIN 53380-2:2006-11 (2006). Testing of plastics - Determination of gas transmission rate - Part 2: Manometric method for testing of plastic films. German Institute for Standardization, Germany.
87. Du, W.X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Friedman, M. (2008). Storage stability and antibacterial activity against

- Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (9), 3082-3088.
88. Đaković, Lj. (2006). Koloidna hemija, 4. izdanje. Zavod za udžbenike, Beograd, Srbija.
89. Elena Velickova , Eleonora Winkelhausen, Slobodanka Kuzmanova, Vitor D. Alves, Margarida Moldão-Martins (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions, *LWT - Food Science and Technology*, 52, 80-92.
90. Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A., Mount, J.R. (2001). Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants Against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. *Journal of Food Protection* 64, 1019-1024.
91. Elizondo N.J., Sobral, P.J.A., Menegalli, F.C., (2009). Development of films based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate Polymers*, 75, 592–598.
92. Elmastaşa, M., Dermirtasa, I., Isildaka, O., & Aboul-Eneinb, H.-Y. (2006). Antioxidant activity of s-carvone isolated from spearmint (*Mentha Spicata* L. *Fam Lamiaceae*). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29 (10), 1465-1475.
93. Ercoşkun, H. i Özkal, S. G. (2011). Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation. *Food Control*, 22, 165-172.
94. Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.
95. Fabra, M.J., Talens, Pau, Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23, 676–683.
96. Fajardo, P., Martins, J.T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101, 349–356.
97. Falade, K. O. i Aworh, O. C. (2004). Adsorption isotherms of osmo-oven dried African star apple (*Chrysophyllum albidum*) and African mango (*Irvingia gabonensis*) slices, *European Food Research and Technology*, 218, 278-283.
98. Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A., Figueiredo, A. C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2005). Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8162-8168.

99. Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115, 66–70.
100. Fazilah, A., Maizura, M., Abd Karim, A., Bhupinder, K., Rajeev, B., Uthumporn, U., Chew, S. H. (2011). Physical and mechanical properties of sago starch – alginate films incorporated with calcium chloride. *International Food Research Journal*, 18 (3), 1027-1033.
101. Feng Y., Han Z., Peng J., Lu J., Xue B., Li L., Ma H., Wang E. (2006). Fabrication and characterization of multilayer films based on Keggin-type polyoxometalate and chitosan. *Materials Letters*, 60, 1588–1593.
102. Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J.A., Sayas-Barberá, E., López-Santoveña, F. (2002). Effect of Paprika (*Capsicum annum*) on Color of Spanish-type Sausages During the Resting Stage. *Journal of Food Science*, 67, 6, 2410-2414.
103. Fernández-Pan, I., Ziani, K., Pedroza-Islas, R., Maté, J. I. (2010). Effect of drying conditions on the mechanical and barrier properties of films based on chitosan. *Drying Technology*, 28 (12), 1350-1358.
104. Ferreira, A. S., Nunes, C., Castro, A., Ferreira, P., Coimbra M. A. (2014). Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers*, 113, 490–499.
105. Fista, G. A., Bloukas, J.G., Siomos, A.S. (2004). Effect of leek and onion on processing and quality characteristics of Greek traditional sausages. *Meat Science*, 68, 163–172.
106. Flieger, M., Kantorová, M., Prell, A., Řezanka, T., Votruba, J. (2003). Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica* (Prague, Czech Republic), 48 (1), 27-44.
107. Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry*, 226, 497–509.
108. Fouad, D. R. G. (2008). Chitosan as an antimicrobial compound: Modes of action and resistance mechanisms. Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität Bonn.
109. Fu, Y., Lim, L. (2012). Investigation of multiple-component diffusion through LLDPE film using an FTIR-ATR technique. *Polymer Testing*, 31, 56–67.
110. Galić, J., Galić, K., Kurtanjek, M., Ciković, N. (2000). Gas permeability and DSC characteristics of polymers used in food packaging, *Polymer Testing*, 20 (1), 49–57.
111. Galić, K. (2009). Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4 (1-2), 23-31.

112. Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62, 309–321.
113. García, M.A., Pinotti, A., Martino, M. N., Zaritzky, N.E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 339–345.
114. García-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasarán I. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, 67, 57–63.
115. Gennadios, A., Hanna, M. A., Kurth, L. B. (1997). Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 337–350.
116. Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S.A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*, 76, 172–181.
117. Ghanbarzadeh, B. i Almasi, H. (2011). Physical Properties of edible emulsified film based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48 (1), 44–49.
118. Giancone, T. (2006). Hydrocolloid-based edible films: composition-structure properties relationship. PhD Thesis, University of Naples-Federico II, Naples, Italy.
119. Giatrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I. N. (2010). Combined Chitosan-Thyme Treatments with Modified Atmosphere Packaging on a Ready-to-Cook Poultry Product. *Journal of Food Protection*, 73, 663–669.
120. Gimeno, O., Ansorena, D., Astiasaran I., Bello, J. (2000). Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. *Food Chemistry*, 69,195–200.
121. Gimeno, O., Astiasaran, I., Bello, J. (2001). Calcium ascorbate as a potential partial substitute NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygiene quality at different concentrations. *Meat Science*, 57, 23-29.
122. Gnanasambadam, R, Hettiarachchy, N.S., Coleman, M. (1997). Mechanical and barrier properties of rice bran films. *Journal of Food Science*, 62 (2), 395-398.
123. Goddard, R. (1990). Packaging Materials. Pira, Leatherhead, Surrey, England.
124. Goddard, J.M., Hotchkiss, J.H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32 (7), 698–725.

125. Gontard, N., i Guilbert, S. (1994). Food Packaging and Preservation. Blackie Academic & Professional, London, UK.
126. Gooday, G.W., Prosser, J.I., Hillman, K., Cross, M.G. (1991). Mineralization of Chitin in an estuarine sediment: The importance of the Chitosan pathway. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19 (5), 395-400.
127. Guirguis, O.W., Abd Elkader, M.F.H., Nasrat, A.A. (2013). Enhancing antimicrobial activity for chitosan by adding Jojoba liquid wax. *Materials Letters*, 93, 353-355
128. Gupta, D. i Haile, A. (2007). Multifunctional properties of cotton fabric treated with chitosan and carboxymethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 69, 164–171.
129. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (1), 91-97.
130. Hagenmaier, R. D. i Shaw, P. E. (1990). Moisture permeability of edible films made with fatty acid and (hydroxypropyl) methylcellulose. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 1799–1803.
131. Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochememical Pharmacology*, 49, 1341-1348.
132. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999). Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985–990.
133. Hammond, M. (2004). The use of chitosan to preserve and extend atlantic salmon quality. M Sc Thesis, The University of Maine, ME, USA.
134. Han, J. H., Seo, G. H., Park, I. M., Kim, G. N., Lee, D. S. (2006). Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. *Journal of Food Science*, 71, 290-296.
135. Hartley, S. (2013). Comparison of methods to evaluate chitosan as an antimicrobial against *Listeria spp.* cultures. M Sc Thesis, Clemson University, SC, USA.
136. Hassel, S., Rodriguez-Saona, L.E. (2011). Application of a handheld infrared sensor for monitoring the mineral fortification in whole grain cornmeal. *Food Anal Methods*. 5, 571-578.
137. Helander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.-L. Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235–244.
138. Hernandez, E. (1994). Edible coatings from lipids and resins. In: Edible coatings and films to improve food quality, Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M. (eds). Technomic publishing, Lancaster, PA, USA, 279-303.

139. Hernandez-Izquierdo, V.M., Krochta, J.M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation-A review. *Journal of Food Science*, 73 (2), 30-39.
140. Houben, J.H., van Dijk, A., Eikelenboom, G., Hoving-Bolink, A.H. (2000). Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on colour stability and lipid oxidation in minced beef, *Meat Science*, 55, 331-336.
141. Hromiš, N., Lazić, V., Markov, S., Vaštag, Ž., Popović, S., Šuput, D., Džinić, N. (2014). Improvement of antioxidant and antimicrobial activity of chitosan film with caraway and oregano essential oils. *Acta periodica technologica*, 45, 33-42.
142. Hutkins, R. W. (2006). Meat fermentation. In: Microbiology and technology of fermented foods, Blackwell Publishing.
143. Ikonić, P. (2013). Razvoj procesa sušenja i zrenja tradicionalne fermentisane kobasice (Petrovska klobása) u kontrolisanim uslovima. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
144. Ikonić, P., Petrović, Lj., Tasić, T., Džinić, N., Jakanović, M., Tomović, V. (2010). Physicochemical, biochemical and sensory properties for the characterization of *Petrovska klobása* (traditional fermented sausage). *Acta Periodica Technologica*, 41, 19-31.
145. ISO 2528 (1995). Sheet materials -Determination of water vapour transmission rate - Gravimetric (dish) method. International Organisation for Standardisation, Switzerland.
146. Jamaluddin, M.F. (2009). Fabrication and Characterization of Composite Biodegradable Films From Chitosan and Corn Silk. B. Ch. E. Thesis, Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, Universiti Malaysia Pahang, Gambang, Pahang, Malaysia.
147. Janero, D.R. (1990). Malonaldehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostics indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radicals and Biological Medicine*, 9, 515-540.
148. Janković, V. (2013). Promene parametara zdravstvene ispravnosti *Petrovačke kobasice* tokom proizvodnje u tradicionalnim i kontrolisanim uslovima. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
149. Janjarasskul T and Krochta JM. (2010). Edible Packaging Materials. *Annual Review of Food Science and Technology* ,1, 415-448.
150. Jeon, Y.-J., Kamil, J. Y. V. A., Shahidi, F. (2002). Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Preservation of Herring and Atlantic Cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,5167-5178.
151. Jeon, Y-J., Shadidi, F., Kamil, J.Y.V.A. (2002). Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Preservation of Herring and Atlantic Cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5167-5178.

152. Jo, C., Lee, J.W., Lee, K.H., Byun, M.W. (2001). Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer. *Meat Science*, 59, 369–375.
153. Jones, J.B. (2010). Physical Characteristics and Metal Binding Applications of Chitosan Films. M Sc Thesis, University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.
154. Jovanović, S. i Džunuzović, J. (2011). Pravci razvoja ambalaže od polimernih materijala. *Hemijska Industrija*, 65 (6), 621–635.
155. Jumaa, M., Müller, B. W. (1999). Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. *International Journal of Pharmaceutics*, 183, 175-184.
156. Kacániová, M., Vuković, N., Chlebo, R. Haščík, P., Rovná, K., Cubon, J., Džugan, M., Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Science*, 64, 927-934.
157. Kameník, J., Saláková, A., Bořilová, G., Pavlík, Z., Standarová, E., Steinhauser, L. (2012). Effect of Storage Temperature on the Quality of Dry Fermented Sausage Poličan. *Czech Journal of Food Science*, 30, 293–301.
158. Kamil, J., Jeon, Y.-J., Shahidi, F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 79, 69–77.
159. Kanatt, S. R., Rao, M.S., Chawla S.P., Sharma A. (2012). Active chitosane polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29, 290-297.
160. Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107, 845–852.
161. Kanatt, S.R., Rao, M.S., Chawla, S.P., Sharma, A. (2012). Active chitosanepolyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29, 290-297.
162. Kanatt, S.R., Rao, M.S., Chawla, S.P., Sharma, A. (2013). Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 321-326.
163. Kasaai, M. R., Charlet, G., Paquin, P., & Arul, J. (2003). Fragmentation of chitosan by microfluidization process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4 (4), 403-413.
164. Kato, Y., Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kiuchi, A., Kaneuchi, C., Ogawa, M. (2000). *Lactobacillus algidus* sp. nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1143–1149.
165. Kawahara, M., Yui, T., Oka, K., Zugenmaier, P., Suzuki, S., Kitamura, S., Okuyama, K., Ogawa, K. (2003). Fourth 3D Structure of the Chitosan Molecule:



- Conformation of Chitosan in Its Salts with Medical Organic Acids Having a Phenyl Group. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67 (7), 1545–1550.
166. Khoshgozaran-Abras, S., Azizi, M. H., Hamidy, Z., & Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-coatings as a function of Aloe vera gel incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2058-2062.
167. Kim, I.-S., Yang, M.-R., Lee, O.-H., Kang, S.-N. (2011). Antioxidant Activities of Hot Water Extracts from Various Spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 4120-4131.
168. Kim, K.M., Son, J.H., Kim, S.-K., Weller, C.L., Hanna, M. (2006). Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. *Journal of Food Science E: Food Engineering and Physical Properties*, 71 (3), 119–124.
169. Kim, K.W. i Thomas, R.L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101, 308–313.
170. Kim, S-J. i Ustunol, Z. (2001). Solubility and Moisture Sorption Isotherms of Whey-Protein-Based Edible Films as Influenced by Lipid and Plasticizer Incorporation *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (9), 4388-4391.
171. Kokkini, S., Karouson, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T. (1997). Autumn Essential Oils of Greek Oregano. *Phytochemistry*, 44, 883-886.
172. Komprda T., Neznalova J., Standara S., Bover-Cid S. (2001). Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented salami Poličan. *Meat Science*, 59, 267–276.
173. Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H., Yu, L.J. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 65, 197–202.
174. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51–63.
175. Kristo, E., Biliaderis, C.G., Zampraka, A. (2007). Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101, 753-764.
176. Krkić, N., Šojić, B., Lazić, V., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., Tomović, V. (2013). Lipid oxidative changes in chitosan-oregano coated traditional dry fermented sausage Petrovská klobása. *Meat Science* 93, 767–770.
177. Krkić, N., Šojić, B., Lazić, V., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., Tomović, M., Džinić, N. (2013). Effect of chitosan-caraway coating on lipid oxidation of traditional dry fermented sausage. *Food Control*, 32, 719–723.
178. Krochta, J.M., De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61–74.

179. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85, 633–640.
180. Kunte, L.A., Gennadios, A., Cuppett, S.L., Hanna, M.A., Weller, C.L. (1997). Cast films from soy protein isolates and fraction. *Cereal Chemistry*, 74, 115–118.
181. Kurek, M., Guinault, A., Voilley, A., Galić, K., Debeaufort, F. (2014). Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chemistry*, 144, 9–17.
182. Kurita, K. (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 117–120.
183. Kurita, K., Kamiya, M., Nishimura, S.I. (1991). Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial n-acetylation of chitosan to develop solubility. *Carbohydrate Polymers*, 16, 83–92.
184. Kusmider, E.A., Sebranek, J.G., Lonergan, S.M., Honeyman, M.S. (2002). Effects of carbon monoxide packaging on color and lipid stability of irradiated ground beef. *Journal of Food Science*, 67 (9), 3463–3468.
185. Lagaron, J.M., Fernandez-Saiz, P., Ocio, M.J. (2007). Using ATR-FTIR Spectroscopy To Design Active Antimicrobial Food Packaging Structures Based on High Molecular Weight Chitosan Polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2554-2562.
186. Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., Boskou, D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oil from Oregano plants grown in Greece. *European Food Research and Technology*, 197, 20–23.
187. Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
188. Lai, F., Loy, G., Manconi, M., Manca, M. L., Fadda, A. M. (2007). Artemisia arborescens L. Essential Oil Loaded Beads: Preparation and Characterization, *American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Science and Technology*, 8 (3), 1-7.
189. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E. (2001). A Study of the Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462
190. Lazić V. i Novaković D. (2010). Ambalaža i životna sredina. Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
191. Lazić V., Gvozdrenović J., Popović S., Novaković D. (2009). Package as an ecological issue. Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi (PTEP), 13 (3), 226-228.

192. Lazić, V., Budinski-Simendić, J., Gvozdenović, J., Simendić, B. (2010). Barrier properties of coated and laminated polyolefin films for food packaging. *Acta Physica Polonica A*, 117, 855-858.
193. Lazić, V., Curaković M., Gvozdenović, J., Petrović, Lj., Đorđević, P. (2002). Karakteristike poliamidnih omotača. *Tehnologija mesa*, 43, 69–73.
194. Lazić, V., Gvozdenović, J., Petrović, T. (2008). Mogućnosti savremenog pakovanja hrane. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi PTEP*, 12, 49-52.
195. Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Duenas, M.T., De la Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116, 889–899.
196. Lee, K.T. (2010). Quality and safety aspects of meat products as affected by various physical manipulations of packaging materials. *Meat Science*, 86, 138–150.
197. Lee, S., Lefèvre, T., Subirade, M., & Paquin, P. (2009). Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. *Food Chemistry*, 113 (1), 191-195.
198. Leistner, L. (2004). Food design by hurdle technology and HACCP. Raps & Co, Kulmbach, Germany.
199. Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270–285.
200. Lertworasirikul, A., Tsue, S., Noguchi, K., Okuyama, K., Ogawa, K.(2003). Two different molecular conformations found in chitosan type II salts. *Carbohydrate Research*, 338 (11), 1229–1233.
201. Lesjak, M. (2011). Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (Cupressaceae). Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
202. Li, H., Xu, Q., Chen, Y., Wan, A. (2014). Effect of concentration and molecular weight of chitosan and its derivative on the free radical scavenging ability. *Journal Of Biomedical Materials Research A*, 102A (3), 911-916.
203. Li, T., Hub, W., Li, J., Zhang, X., Zhu, J., Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control*, 25, 101-106.
204. Lilić, S., Borović, B., Vranić, D. (2013). Uticaj smanjenog sadržaja natrijum-hlorida na proces fermentacije i kvalitet suvih fermentisanih kobasica. *Tehnologija mesa*, 54 (2), 150–159.
205. Lin, K.-W., Chao, J.-Y. (2001). Quality characteristics of reduced-fat Chinese-style sausage as related to chitosan's molecular weight. *Meat Science*, 59, 343–351.

206. Lin, S. (2012). Development of Edible Packaging for Selected Food Processing Applications. PhD Thesis, The Ohio State University, OH, USA.
207. Lindgren, S. E. i Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 7, 149–163.
208. Liu, H., Du, Y., Wang, X., Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 147–155.
209. Liu, H., Wang, C., Zou, S., Wei, Z., Tong, Z. (2012). Simple, Reversible Emulsion System Switched by pH on the Basis of Chitosan without Any Hydrophobic Modification. *Langmuir*, 28 (30), 11017–11024.
210. Liu, M., Zhou, Y., Zhang, Y., Yu, C. Cao, S. (2013). Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. *Food Hydrocolloids*, 33, 186-191.
211. Liu, N., Chen, X.-G., Park, H.-J., Liu, C.-G., Liu C.-S., Meng, X.-H., Yu. L.-J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. *Carbohydrate Polymers* 64, 60–65.
212. Liu, T. (2008). Edible Films from Starch and Chitosan: Formulation and Gas Permeabilities. M Sc Thesis, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.
213. Ludwiczak, S. i Mucha, M. (2010). Modeling of water sorption isotherms of chitosan blends, *Carbohydrate Polymers*, 79, 34-39.
214. MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.
215. Madsen, H.L. i Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 271-277.
216. Mandić, A. (2007). Antioksidativna svojstva ekstrakata semena sorti belog grožđa. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
217. Mandić, A., Sedej, I., Sakač, M., Mišan, A. (2012). Static Headspace Gas Chromatographic Method for Aldehydes Determination in Crackers. *Food Analytical Methods*, 6 (1), 61–68.
218. Mantis, F., Burriel, A.R., Sabatakou, O., Vacalopoulos, A., Ramantanis, S. (2007). Some factors determining the shelf life of vacuum packed heattreated Greek sausages. *Veterinarski Arhiv*, 77, 229-235.
219. Marques, S.C.P. (2012). Edible Coatings Based On Chitosan-Beeswax Emulsions. M Sc Thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal.

220. Martínez, L., Cilla, I., Beltran, J. A., Roncales, P. (2007). Effect of illumination on the display life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. Influence of the addition of rosemary, ascorbic acid and black pepper. *Meat Science*, 75, 443-450.
221. Martínez, L., Djenane, D., Cilla, I., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2006). Antioxidant effect of rosemary, borage, green tea, pu-erh tea and ascorbic acid on fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. Influence of the presence of sodium chloride. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1298–1307.
222. Martinou, A., Bouriotis, V., Stokke, B.T., Varum, K.M. (1998). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-acetylated chitosans. *Carbohydrate Research* 311(1-2), 71-8.
223. Martin-Polo, M., Mauguin, C., Voilley A. (1992). Hydrophobic Films and Their Efficiency against Moisture Transfer. 1. Influence of the Film Preparation Technique. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 40, 407-412.
224. Martin-Polo, M., Voilley, A., Blond, G., Colas, B., Mesnier, M., Floquet, N. (1992). Hydrophobic Films and Their Efficiency against Moisture Transfer. 2. Influence of the Physical State. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 413-418.
225. Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Vicente A. A. (2012). Influence of  $\alpha$ -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27, 220-227.
226. Mathew, S., Abraham, T. E. (2008). Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826–835.
227. Mathew, S., Brahmakumar, M., & Abraham, T. E. (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch- chitosan blend films. *Biopolymers*, 82, 176-187.
228. Mayachiew, P. i Devahastin, S. (2008). Comparative evaluation of physical properties of edible chitosan films prepared by different drying methods. *Drying Technology*, 26 (2), 176-185.
229. Mazeau, K., Winter, W., Chanzy, H. (1994). Molecular and Crystal Structure of a High-Temperature Polymorph of Chitosan from Electron Diffraction Data. *Macromolecules*, 27, 7606-7612.
230. McClements, D. J. (1999). Food emulsions. principles, practice and techniques. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
231. McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *Journal of Food Science*, 58, 899-903.

232. McHugh, T.H. i Krochta, J.M. (1994), Dispersed phase particle size effects on water vapor permeability of whey protein–beeswax edible emulsion films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 18, 173–188.
233. Mellencamp, M.A., Koppien-Fox, J., Lamb, R., Dvorak, R. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of oregano essential oil. Proceedings – Posters of Safe Pork 2011, 354-357.
234. Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I. (2000). Chemical Composition and Antioxidant Effect of Glycosidically Bound Volatile Compounds from Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry* 71, 79-83.
235. Min, B. i Ahn, U. (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Science and Biotechnology*, 14, 152–163.
236. Min, S.C., Janjarasskul, T. i Krochta, J.M. (2009). Tensile and moisture barrier properties of whey protein-beeswax layered composite films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 251–257.
237. Mohamed, S., Zaky, W., Kassem, J., Abbas, H., Salem, M.M.E., Said-Al Ahl, H.A.H. (2013). Impact of Antimicrobial Properties of Some Essential Oils on Cheese Yoghurt Quality. *World Applied Sciences Journal*, 27 (4), 497-507.
238. Mohan, C.O., Ravishankar, C.N., Lalitha, K.V., Srinivasa Gopal T.K. (2012). Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26, 167-174.
239. Molina, V., Valdés, S., Carbajal, D., Arruzazabala, L., Menéndez, R., Más, R. (2001). Antioxidant Effect of D-002 on Gastric Mucosa of Rats with Experimentally Induced Injury. *Journal of Medicinal Food*, 4 (2), 79-83.
240. Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 477-484.
241. Morales, F.J., i Jimenez-Perez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72 (1), 119–125.
242. Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67–89.
243. Mrkić, S., Galić, K., Ivanković, M., Hamin, S., Ciković, N. (2006). Gas transport and thermal characterization of mono- and Di-polyethylene films used for food packaging, *Journal of Applied Polymer Science*, 99 (4), 1590–1599.
244. Mun, S., Decker, E.A., McClements J.D. (2006). Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water

- emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296 (2), 581–590.
245. Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C. (2005). Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Advances in Polymer Science*, 186, 151–209.
246. Nadarajah, K. (2005). Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan. Louisiana State University, Agricultural and Mechanical College, LA, USA.
247. Nadarajah, K., No, H.K., Prinyawiwatkul, W., Bansode, R., Silva, L.V.A., Meyers, S.P. (2003). Extending the shelf life of fresh catfish fillets during refrigerated storage by chitosan coating. IFT Annual Meeting Book of Abstracts. Ill.: Institute of Food Technologists, Chicago, IL. Chicago, July 12-16, 2003, 76A-4.
248. Navarro-Tarazaga, M.L., Massa, A., Pérez-Gago, M.B. (2011). Effect of beeswax content on hydroxypropyl methylcellulose-based edible film properties and postharvest quality of coated plums (Cv. Angeleno). *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2328-2334
249. Nguyen, M. X. H. (2012). Characterization of allergenic and antimicrobial properties of chitin and chitosan and formulation of chitosan-based edible film for instant food casing. School of Applied Sciences. RMIT University, Melbourne, Australia.
250. Nicholas, T.A. (2003). Antimicrobial use of native and enzymatically degraded chitosans for seafood applications. M Sc Thesis, The University of Maine, ME, USA.
251. No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65–72.
252. Norajit, K., Kim K. M., Ryu G. H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98, 377–384.
253. Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S., Yamamoto, K., Peck, G.E. (2001). Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27, 143–157.
254. Obadiah, A., Kankan, R., Ramesh, P., Rama-subbu, A., Vasanth Kumar, S. (2012). Isolation of carvone and phellandrene from *Murraya koenigii* and study of their antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 149-150.
255. Ogawa, K. (1991). Effect of Heating an Aqueous Suspension of Chitosan on the Crystallinity and Polymorphs. *Agricultural and biological chemistry*, 55 (9), 2375-2379.

256. Ogawa, K. i Inukai, S. (1987). X-ray diffraction study of sulfuric, nitric, and halogen acid salts of chitosan. *Carbohydrate Research*, 160, 425-433.
257. Ogawa, K., Yui, T., Okuyama, K. (2004). Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 1–8.
258. Oguzlu, H. i Tihminlioglu, F. (2010). Preparation and Barrier Properties of Chitosan-Layered Silicate Nanocomposite Films. *Macromolecular symposya*, 298, 91–98.
259. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi S. H., Hosseini S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120, 193–198.
260. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122, 161–166.
261. Okuyama, K., Noguchi, K., Kanenari, M., Egawa, T., Osawa, K., Ogawa, K. (2000). Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers* 41, 237–247.
262. Okuyama, K., Osawa, K., Hanafusa, Y., Noguchi, K., Ogawa, K. (2000). Relaxed 2/1-Helical Conformation of Type II Chitosan has a Tetrasaccharide Motif. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 19 (6), 789-794.<sup>a</sup>
263. Olabarrieta, I. (2005). Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films. PhD Thesis, KTH Fibre and polymer technology, Stockholm, Sweden.
264. Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C., Jackson, M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70, 205-210.
265. Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bègin, A., Holley R.A. (2000). Inhibition of Surface Spoilage Bacteria in Processed Meats by Application of Antimicrobial Films Prepared with Chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139–148.
266. Papadima, S.N. i Bloukas, J.G. (1999). Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Science*, 51, 103-113.
267. Papineau, A.M., Hoover, D.G., Knorr, D., Farkas, D.F. (1991). Antimicrobial Effect of Water-Soluble Chitosans with High Hydrostatic Pressure. *Food Biotechnology* 5, 45-57.
268. Paquin, P. (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal*, 9 (3-6), 329-335.



269. Park, P.-J., Je, J.-Y., Kim, S.-K. (2004). Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymers* 55, 17–22.
270. Park, S.-I., Marsh, K.S., Dawson, P. (2010). Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. *Meat Science*, 85, 493–499.
271. Park, S.-I., Zhao, Y. (2004). Incorporation of high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 1933-1937.
272. Park, S.Y., Marsh, K.S., Rhim, J.W. (2002). Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. *Journal Of Food Science*, 67 (1), 194-197.
273. Parra V., Viguera J., Sánchez J., Peinado J., Espárrago F., Gutierrez J.I., Andrés, A.I. (2010). Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period chilled storage of dry-cured Iberian ham. *Meat Science*, 84, 760–768.
274. Pasanphan, W., Buettner, G.R., Chirachanchai, S. (2010). Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydrate Research*, 345, 132–140.
275. Pauly, A. S. (1999). Permeability and diffusion data. In: *Polymer Handbook*, Brandrup, J., Immergut, E. H., Grulke, E. A. (eds.), John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 4th edition.
276. Payet, L., Terentjev, E.M. (2008). Emulsification and Stabilization Mechanisms of O/W Emulsions in the Presence of Chitosan. *Langmuir*, 24 (21), 12247-12252.
277. Pelissari F.M., Grossmann M.V.E., Yamashita F., Pineda E.A.G. (2009). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 7499-7504.
278. Peng, C. (1998). Synthesis of crosslinked chitosan-crown ethers and evaluation of these products as adsorbents for metal ions. *Journal of Applied Polymer Science*, 70, 501-506.
279. Peng, Y. i Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
280. Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C., Sensidoni, A. (2003). Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59 (1), 25-32.
281. Pérez-Alvarez, J. A., Sayas-Barberá, M. E., Fernández-López, J., Aranda-Catalá, V. (1999). Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research International*, 32, 599-607.

282. Pérez-Gago, M.B. i Krochta, J.M. (1999). Water Vapor Permeability of Whey Protein Emulsion Films as Affected by pH. *Journal of Food Science*, 64, 695-698.
283. Pérez-Gago, M.B. i Krochta, J.M. (2001). Lipid Particle Size Effect on Water Vapor Permeability and Mechanical Properties of Whey Protein/Beeswax Emulsion Films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 996-1002.
284. Pérez-Gago, M.B., Nadaud, P., Krochta, J.M. (1999). Water vapour permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, 64, 1034–1037.
285. Periolatto, M., Ferrero, F., Vineis, C. (2012). Antimicrobial chitosan finish of cotton and silk fabrics by UV-curing with 2-hydroxy-2-methylphenylpropane-1-one. *Carbohydrate Polymers*, 88, 201–205.
286. Péroval, C., Debeaufort, F., Despre, D., Voilley, A., (2002). Edible arabinoxylanbased films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3977–3983.
287. Perrier-Cornet, J. M., Marie, P., Gervais, P. (2005). Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *Journal of Food Engineering*, 66 (2), 211-217.
288. Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 264–271.
289. Petrović, Lj., Džinić, N., Tomović, V., Lazić, V., Jokanović, M., Tasić, T., Ikonić, P., Šojić, B., Savatić, S., Krkić, N. (2011). Nova tehnologija pakovanja *Petrovačke kobasice*, Tehničko rešenje.
290. Petrović, Lj., Džinić, N., Ikonić, P., Tasić, T., Tomović, V. (2011a). Quality and safety standardization of traditional fermented sausages. *Tehnologija mesa*, 2, 234-244.
291. Petrović, Lj., Džinić, N., Tomović, V., Ikonić, P., Tasić, T. (2007). Tehnološki Elaborat o načinu proizvodnje i specifičnim karakteristikama proizvoda *Petrovska klobasa (Petrovačka kobasica)*. Rešenje o registraciji oznake geografskog porekla *Petrovska klobasa (Petrovačka kobasica)* kao IMENA POREKLA za suvomesnati proizvod-fermentisanu kobasicu, broj: 9652/06 Г-03/06, 21. 05. 2007. godine, Republika Srbija, Zavod za intelektualnu svojinu.
292. Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641–678.

293. Pinnamaneni, S., Das, N. G., Das, S. K. (2003). Comparison of oil-in-water emulsions manufactured by microfluidization and homogenization. *Pharmazie*, 58 (8), 554-558.
294. Pinotti, A., García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. (2007). Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21, 66–72.
295. Popović, S. (2013). Istraživanje dobijanja i karakterizacija biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
296. Portes, E., Gardrat, C., Castellan, A., Coma V. (2009). Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcuminoid derivatives exhibiting antibacterial and antioxidative properties. *Carbohydrate Polymers*, 76, 578–584.
297. Pranoto, Y., Rakshit, S.K., Salokhe, V.M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 859–865.
298. Pranoto, Y., Rakshit, S.K., Salokhe, V.M. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Resipos International*, 38, 267–272.
299. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa. Sl. glasnik RS, br. 31/2012.
300. Cerqueira, M.A., Lima, A.M., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., Vicente, A.A. (2009). Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. *Journal of Food Engineering*, 94, 372–378.
301. Prior, R. Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods For the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
302. Qiu, C., Zhao, M., Sun, W., Zhou, F., Cui, C. (2013). Changes in lipid composition, fatty acid profile and lipid oxidative stability during Cantonese sausage processing. *Meat Science*, 93, 525–532.
303. Qiu, X., Chen, S., Liu, G., Yang, Q. (2014). Quality enhancement in the Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets stored at 4 °C by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract. *Food Chemistry*, 162, 156–160.
304. Quek, S. Y., Chok N. K., Swedlund, P. (2007) The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46 (5), 386-392.
305. Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457–1465.

306. Radheshkumar, C. i Münstedt, H. (2006). Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites—Ag<sup>+</sup> release measured by anode stripping voltammetry. *Reactive and Functional Polymers*, 66 (7), 780–788.
307. Radovanović, R. i Popov-Raljić, J. (2001). Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Poljoprivredni fakultet, Beograd, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
308. Ramos-García, M., Bosquez-Molina E., Hernández-Romano J., Zavala-Padilla G., d, Terrés-Rojas E., Alía-Tejacal I., Barrera-Necha L., Hernández-López M., Bautista-Baños, S. (2012). Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomatoes. *Crop Protection*, 38, 1-6.
309. Rašeta, M., Vesković-Moračanin, S., Borović, B., Karan, D., Vranić, D., Trbović, D., Lilić, S. (2010). Microclimate conditions during ripening of traditionally produced fermented sausages. *Meat Technology*, 51 (1), 45–51.
310. Rede, R., Petrović, Lj. (1997). Tehnologija mesa i nauka o mesu. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
311. Reische, D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R. (2008). Antioxidants. In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition And Biotechnology*, Akoh, C.C., Min, D. B. (eds.), Crc Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 3rd Ed.
312. Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Hanna, M.A. (2002). Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 15, 199–205.
313. Rhim, J.W., Weller, C.L., Ham, K.S. (1998). Characteristics of chitosan films as affected by the type of solvent acid. *Food Science and Biotechnology*, 7 (4), 263-268.
314. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31 (7), 603–632.
315. Ritthidej, G.C., Phaechamud, T., Koizumi, T. (2002). Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 11–22.
316. Rivero, S., García, M.A., Pinotti, A. (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 369–375.
317. Rivero, S., García, M.A., Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90, 531–539.
318. Robertson, G. (2006). *Food Packaging: Principles and Practice*. CRC Press Taylor and Francise, New Zealand.
319. Rodriguez, M.S., Ramos, V., Anullo, E. (2003). Antimicrobial Action of Chitosan Against Spoilage Organisms in Precooked Pizza. *Journal of Food Science*, 68, 271-274.

320. Rodríguez-Núñez, J.R., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Ramírez-Wong, B., Torres-Chavez, P., Cortey-Rocha, M.O. (2012). Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*. *Internacional Journal of Food Science and Technology*, 47, 2127-2133.
321. Rohlík, B. A., Pipek, P., Pánek, J. (2013). The effect of natural antioxidants on the colour and lipid stability of paprika salami. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 307–312.
322. Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., Pan, Z., McHugh, T.H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81 (3), 634–41.
323. Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to freshcut fruits - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (10), 438-447.
324. Rooney, M. L. (1995). Overview of active food packaging. In: Active Food Packaging, Rooney, M. L. (ed), Springer, New York, NY, USA, 1-37.
325. Ross, C.F., Smith, D.M. (2006). Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods. *Comprehensive Review Food Science Food Safety*, 5, 18–25.
326. Rossman, J.M. (2009). Edible films and coatings for food applications. In: Edible films and coatings for food applications, Embuscado, M.E., Huber, K.C. (eds.). Springer, New York, NY, USA., 367-390.
327. Ruberto, G. i Baratta, M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167-174.
328. Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I., Vieira, M.C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115, 466–474.
329. Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M., Rovira, J., Jaime, I. (2008). Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids. *Meat Science*, 80, 1182–1187.
330. Ruiz-Moyano, S., Martín, A., José Benito, M., Hernández, A., Casquete, R., de Guia Córdoba, M. (2011). Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. *Food Microbiology*, 28, 839-847.
331. Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of

- chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30, 386-392.
332. Russo, G. M., Simon, G. P., Incarnato, L. (2006). Correlation between rheological, mechanical, and barrier properties in new copolyamide-based nanocomposite films. *Macromolecules*, 39 (11), 3855–3864.
333. Sadeghi, A.M.M., Dorkoosh, F.A., Avadi, M.R., Saadat, P., Rafiee-Tehrani, M., Junginger, H.E. (2008). Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 355, 299–306.
334. Saláková A., Kameník J., Pavlík Z., Buchtová H. (2010). Vliv skladování syrového vepřového sádla (–18°C) na kvalitu trvanlivých fermentovaných salámů. In: XXXVI. Seminář o jakosti potravin a potravinových surovin –“Ingrový dny”, MZLU, Brno.
335. Salgado, A., García Fontán, M.C., Franco, I., López, M., Carballo, J. (2005). Biochemical changes during the ripening of *Chorizo de cebolla*, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chemistry*, 92, 413–424.
336. Samojlik, I., Lakić, N., Mimica-Dukić, N., Đaković-Švajcer, K., Božin, B. (2010). Antioxidant and Hepatoprotective Potential of Essential Oils of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and Caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8848–8853
337. Sánchez-González L., Cháfer, M., González-Martínez C., Chiralt A., Desobry, S. (2011). Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering*, 105, 138–143.
338. Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82, 277-283.
339. Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109.
340. Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
341. Saremnezhad, S., Azizi, M.H., Barzegar, M., Abbasi, S., Ahmadi, E. (2011). Properties of a new edible film made of Faba bean protein isolate. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 13, 181-192.

342. Sathivel, S. (2005). Chitosan and Protein Coatings Affect Yield, Moisture Loss, and Lipid Oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Fillets During Frozen Storage. *Journal Of Food Science*, 70, E455- E459.
343. Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J., Prinyawiwatkul, W. (2007). The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83, 366–373.
344. Schreiber, S., Bozell, J., Hayes, D., Zivanovic, S. (2013). Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 33, 207-214.
345. Schreiber, S.B. (2012). Chitosan-gallic acid films as multifunctional food packaging. M Sc Thesis, University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.
346. Schubert, H. (1997). Advances in the mechanical production of food emulsions. In: Engineering and food, Jowitt, R. (ed.), Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 82.
347. Schulz H., Özkan G., Baranska M., Krüger H., a, Özkan M. (2005). Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 39, 249–256.
348. Schulz, P.C., Rodríguez, M.S., Del Blanco, L.F., Pistonesi M., Agullo, E. (1998). Emulsification properties of chitosan. *Colloid & Polymer Science*, 276 (12), 1159-1165.
349. Sébastien, F., Stéphane, G., Copinet. A., Coma, V. (2006). Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydrate Polymers*, 65, 185–193.
350. Sebti, I., Chollet, E., Degraeve, P., Noel, C., Peyrol, E. (2007). Water Sensitivity, Antimicrobial, and Physicochemical Analyses of Edible Films Based on HPMC and/or Chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3), 693-699.
351. Shahidi, F. i Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Shahidi, F. (ed.), John Wiley & Sons, Inc. Sixth Edition.
352. Shahidi, F., Kamil, J., Arachchiand, V., Jeon, Y-J. (1999). Food Applications of Chitin and Chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10 (2), 37-51.
353. Shahidi, F., Kamil, J., Jeon, Y.-J., Kim, S.-K. (2002). Antioxidant role of chitosan in a cooked cod (*gadus mornua*) model system. *Journal of Food Lipids*, 9, 57-64.
354. Shahidi, F., Synowiecki, J. (1991). Isolation and Characterisation of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and

- Shrimp (*Pandalus Borealis*) Processing Discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1527-1532.
355. Shellhammer, T. H., i Krochta, J. M. (1997). Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type amount. *Journal of Food Science*, 62, 390–394.
356. Simić, A., Rančić, A., Sokovic, M.-D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., Marin, P.-D. (2008). Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, 46 (6), 437-441.
357. Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C. J., Wess, T. J. (2004). Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, 25 (5), 795-801.
358. Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Rosa, M.D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 634-643.
359. Siripatrawan, U. i Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27, 102-108.
360. Siripatrawan, U., Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770-775.
361. Skandamis, P.N. i Nychas G.J.E. (2002). Preservation of Fresh Meat with Active and Modified Atmosphere Packaging Conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 35– 45
362. Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., Aguilera, J.M. (2010). Food hydrocolloid edible films and coatings. Nova Science Publishers Inc., New York, NY, USA.
363. Sohail, S.S., Wang, B., Biswas, M.A. S., Oh, J.-H. (2006). Physical, Morphological, and Barrier Properties of Edible Casein Films with Wax Applications. *Journal Of Food Science*, 71, c255-c250.
364. Sökmen, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polission, M., Tepe, B, Akpulat, H.A., Sahin, F., Sökmen, A. (2004). In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and Callus Cultures of *Origanum acutidens*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3309-3312.
365. Sothornvit, R. i Pitak, N. (2007). Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International*, 40 (3), 365–370.



366. Soultos, N., Tzikas, Z., Abraham, A., Georgantelis, D., Ambrosiadis, I. (2008) Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages. *Meat Science*, 80, 1150–1156.
367. Souza, V., Monte, M., Pinto, L. (2011). Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (9), 1856–1862.
368. Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar, K.R., Tharanathan, R.N. (2004). Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*, 63 (1), 79–85.
369. SRPS ISO 1442 (1998). Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja vlage. Institut za standardizaciju Srbije.
370. SRPS ISO 2917 (2004). Meso i proizvodi od mesa. Merenje pH. Institut za standardizaciju Srbije.
371. Stepto, R.F.T. (2003). The Processing of Starch as a Thermoplastic. *Macromolecular symposya*, 201, 203-212.
372. Stojimenović, J.P. (1997). Sinteza antioksidanata i uticaj na aktivnost slobodnih radikala prirodnih i model sistema, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
373. Strawbridge, K. B., Ray, E., Hallett, F. R., Tosh, S. M., Dalgleish, D. G. (1995). Measurement of particle-size distributions in milk homogenized by a microfluidizer- estimation of populations of particles with radii less than 100 nm. *Journal of Colloid and Interface Science*, 171 (2), 392-398.
374. Sudharsan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D. (1992). Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnology*, 6, 257-272.
375. Sukkunta, S. (2005). Physical and mechanical properties of chitosan-gelatin based film. M Sc Thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
376. Suman, S.P., Mancini, R.A, Joseph, P., Ramanathan, R., Konda, M.K.R., Dady, G., Yin, S. (2010). Packaging-specific influence of chitosan on color stability and lipid oxidation in refrigerated ground beef. *Meat Science* 86, 994–998
377. Sun, W., Zhao, Q., Zhao, H., Zhao, M., Yang, B. (2010). Volatile compounds of Cantonese sausage released at different stages of processing and storage. *Food Chemistry*, 121, 319–325.
378. Suyatma, N.E., Tighzert, L., Copinet, A. (2005). Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3950-3957.
379. Šakota, T., Lazić, V., Gvozdenović, J. (2002). Uticaj karakteristika ambalažnih materijala na održivost viršli. *Tehnologija mesa*, 43 (1–2), 47–51.

380. Škaljac, S. (2014). Uticaj različitih tehnoloških parametara na formiranje boje tradicionalne fermentisane kobasice (*Petrovačka kobasica*) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
381. Šojić, B. (2013). Ispitivanje lipolitičkih i oksidativnih promena u tradicionalnoj fermentisanoj kobasici (*Petrovačka kobasica*) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
382. Šojić, B., Petrović, Lj., Mandić, A., Sedej, I., Džinić, N., Tomović, V., Jokanović, M., Tasić, T., Škaljac, S., Ikonić, P. (2014). Lipid oxidative changes in traditional dry fermented sausage *Petrovská klobása* during storage. *Chemical Industry*, 68 (1), 27–34.
383. Takahashia, T., Imaia, M., Suzukia, I., Sawai, J. (2008). Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated by the deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 485–491.
384. Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S. (2004). Dry Fermented sausages. In: *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* (1<sup>st</sup> ed.), Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Hansen, A.S., Josephsen, J., Nip, W.-K., Stanfield, P.S., Toldrá, F. (eds.). Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA, 397-416.
385. Tan, J. J., Wang, J., Wang, L. Y., Xu, J., Sun, D. J. (2011). In Situ Formed Mg(OH)<sub>2</sub> Nanoparticles as pH-Switchable Stabilizers for Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359 (1), 155–162.
386. Tanaka, T., Nagao, S., Ogawa, H. (2001). Attenuated total reflection fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy of functional groups of humic acid dissolving in aqueous solution. *Analytical Sciences*, 17, 1081-1084.
387. Tasić, T. (2012). Formiranje biogenih amina u tradicionalnoj fermentisanoj kobasici (*Petrovská klobása*) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
388. Tikhonov, V.E., Stepnova, E.A., Babak, V.G., Yamskov, I.A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H.B., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J., Gerasimenko, D.V., Avdienko, I.D., Varlamov, V.P. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a lowmolecularweight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl-derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 64, 66–72.
389. Toldrá, F., Sanz, Y., Flores, M. (2001). Meat fermentation technology. In: *Meat Science and Applications*, Hui, Y.H., Nip, W.K., Rogers, R.W., Young, O.A. (eds.) Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA, 537-561.
390. Tomida, H., Fujii, T., Furutani, N., Michihara, A., Yasufuku, T., Akasaki, K., Maruyama, T., Otagiri, M., Gebicki, J.M., Anraku, M. (2009). Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. *Carbohydrate Research*, 344, 1690–1696.

391. Torres, F.G., Troncoso, O.P., Torres, C., Díaz, D.A., Amaya E. (2011). Biodegradability and mechanical properties of starch films from Andean crops. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 603–606.
392. Tovar, L., Salafranca, J., Sánchez, C., Nerín, C. (2005). Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5270–5275.
393. Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, P.K. (2009). Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 372–376
394. Trung, T.S., Qui, N.T., Stevens, W.F. (2009). Properties of different degree o-deacetylation shrimp chitosan films affected by organic acid solvents. *Scientific journal of Fisheries Technology*, 136-140.
395. Tsigarida, E. i Nychas, G.J.E. (2001). Ecophysiological attributes of *Lactobacillus sp.* and *Pseudomonas sp.* on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 696– 705.
396. Tsimidou, M. i Boskou, D. (1994). Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In: Spices, herbs and edible fungi. Charalambous, G. (ed.), Elsevier, Amsterdam, 273–284.
397. Tyburcy A. i Kozyra D. (2010). Effects of composite surface coating and pre-drying on the properties of kabanosy dry sausage. *Meat Science*, 86, 405–410.
398. Tyburcy, A., Wasiak, P., Cegiełka, A. (2010). Application of composite protective coatings on the surface of sausages with different water content. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9, 151-159
399. Urban, K., Wagner, G., Schaffner, D., Roglin, D., Ulrich, J. (2006). Rotor-stator and disc systems for emulsification processes. *Chemical Engineering and Technology*, 29 (1), 24-31.
400. Valencia, I., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2006). Stability of linseed and antioxidants containing dry fermented sausages: A study of the lipid fraction during different storage conditions. *Meat Science*, 73, 269–277.
401. Valencia, I., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2007). Development of dry fermented sausages rich in docosahexaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium sp.*: Influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. *Food Chemistry*, 104, 1087–1096.
402. van Tuil, R., Fowler, P., Lawther, M., Webber, C. (2000). Properties of biobased packaging materials. In: Biobased packaging materials for the food industry, Weber, C. (ed), KVL, Frederiksberg C, Denmark, 13-44.
403. Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids* 23, 536–547.

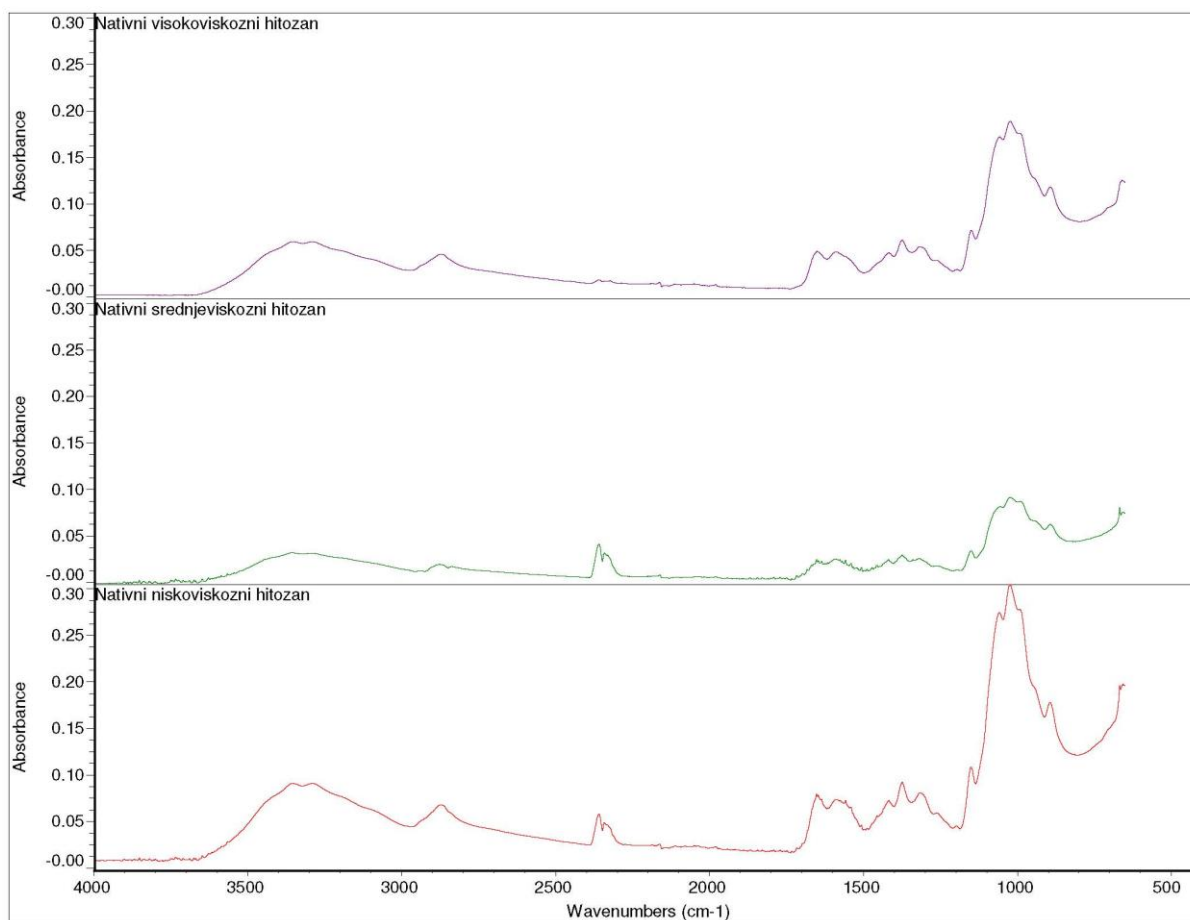
404. Vargas, M., Perdones, Á., Chiralt, A., Cháfer, M., González-Martínez, C. (2011). Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films. *Food Hydrocolloids*, 25 (5), 1158-1164.
405. Vasilev, D., Vuković, I., Saičić, S., Vasiljević, N., Milanović-Stevanović, M., Tubić, M. (2010). Sastav i važnije promene masti funkcionalnih fermentisanih kobasica. *Tehnologija mesa*, 51 (1), 27–35.
406. Vekiari, S. A., Oreopoulou, V., Tzia, C., Thomopoulos, C. D. (1993). Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *Journal of American Oil Chemical Society*, 70, 483–487.
407. Velebit, B. i Petrović, Z. (2012). Antimikrobna pakovanja u industriji hrane. *Tehnologija mesa*, 53 (1), 71–79.
408. Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Moldão-Martins, M. i Alves, V. (2013). D. Characterization of multilayered and composite edible films from chitosan and beeswax. *Food Science and Technology International*, 21 (2), 83–93.
409. Vieira, M.G.A., da Silva, M.A., dos Santos, L.O., Beppu, M.M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47 (3) (2011) 254–263.
410. Vignati, E., Piazza, R. (2003). Pickering Emulsions: Interfacial Tension, Colloidal Layer Morphology, and Trapped-Particle Motion. *Langmuir*, 19 (17), 6650–6656.
411. Villalobos, R. Chanona, J. Hernandez, P. Gutierrez G. Chiralt, A. (2005), Gloss and transparency of hydroxypropylmethylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19, 53-61.
412. Vuković I. (2006). Osnove tehnologije mesa. Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje, Veterinarska komora Srbije, Beograd.
413. Vuković, I. (2012). Osnove tehnologije mesa. Četvrto izdanje, Veterinarska komora Srbije, Beograd.
414. Vuković, I., Saičić, S., Vasilev, D. (2011). Prilog poznavanju važnijih parametara kvaliteta (domaćeg) kulena. *Tehnologija mesa*, 52 (1), 134–140.
415. Wan, A., Xu, Q., Sun, Y., Li, H. (2013). Antioxidant Activity of High Molecular Weight Chitosan and N,O Quaternized Chitosans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6921–6928.
416. Wang, G.-H., (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, 55, 916–919.

417. Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., Zhou J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32, 35-41.
418. Wei, A. i Shibamoto, T. (2007). Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (5), 1737-1742.
419. Weist, J. L., i Karel, M. (1992). Development of a fluorescence sensor to monitor lipid oxidation. 1. Fluorescence spectra of chitosan powder and polyamide powder after exposure to volatile lipid oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1158-1162.
420. Wiles, J.L., Vergano, P.J., Barron, F.H., Bunn, J.M., Testin, R.F. (2000). Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *Journal of Food Science*, 65 (7), 1175-1179.
421. Wu, Y., Rhim, J.W., Weller, C.L., Hamouz, F., Cuppett, S., Schnepf, M., (2000). Moisture loss and lipid oxidation for precooked patties stored in edible coatings and films. *Journal of Food Science*, 65, 300-304.
422. Xie, Y.J., Liu, X.F., Chen, Q. (2007). Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 69,142–147.
423. Xing, R., Liu, S., Guo, Z., Yu, H., Wang, P., Li, C., Lia, Z., Li, P. (2005). Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 1573–1577.
424. Xiufang, X., i Boahua, K. (2008). Extending Shelf Life Of Chilled Pork By Combination Of Chitosan Coating With Spice Extracts. *Journal of Northeast Agricultural University*, 15, 33-37.
425. Yang, L., i Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33, 571–578.
426. Yasufuku, T., Anraku, M., Kondo, Y., Hata, T., Hirose, J., Kobayashi, N., Tomida, H. (2010). Useful Extend-release Chitosan Tablets with High Antioxidant Activity. *Pharmaceutics*, 2, 245–257.
427. Ye, M., Neetoo, H., Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, 25, 260–268.
428. Ye, M., Neetoo, H., Chen, H. (2008). Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 235–240.<sup>a</sup>
429. Yen, M.T., Yang, J.H., Mau, J.L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74, 840–844.

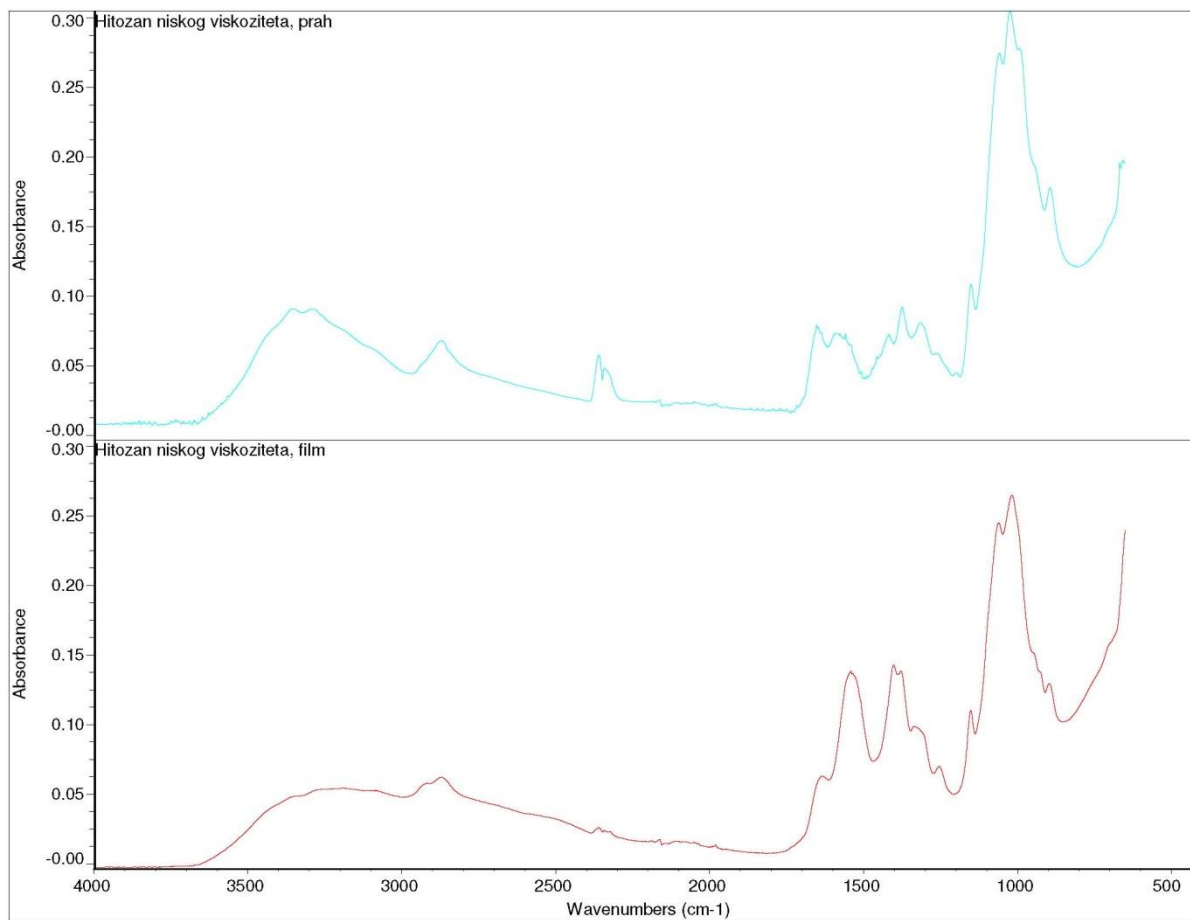
430. Yingyuad, S., Ruamsin, S., Reekprkhon, D., Douglas, S., Pongamphai, S., Siripatrawan, U. (2006). Effect of Chitosan Coating and Vacuum Packaging on the Quality of Refrigerated Grilled Pork. *Packaging Technology And Science*, 19, 149–157.
431. Yoo, S., Krochta, J.M. (2011). Whey protein-polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91 (14), 2628-2636.
432. Yui, T., Imada, K., Okuyama, K., Obata, Y., Suzuki, K., Ogawa, K. (1994). Molecular and Crystal Structure of the Anhydrous Form of Chitosan. *Macromolecules*, 27, 7601-7605.
433. Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, 66, 415–423.
434. Zhang, L., Dudhani, A., Lundin, L., Kosaraju S.L. (2009). Macromolecular conjugate based particulates: Preparation, characterisation and evaluation of controlled release properties. *European Polymer Journal*, 45, 1960–1969.
435. Zhang, W., Xiao, H., Qian, L. (2014). Beeswax–chitosan emulsion coated paper with enhanced water vapor barrier efficiency. *Applied Surface Science*, 300, 80–85.
436. Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A.F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70, 45–51.
437. Zivanovic, S., Li, J., Davidson, P. M., Kit K. (2007). Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films. *Biomacromolecules*, 8, 1505-1510.

## PRILOZI

## Prilog 1.

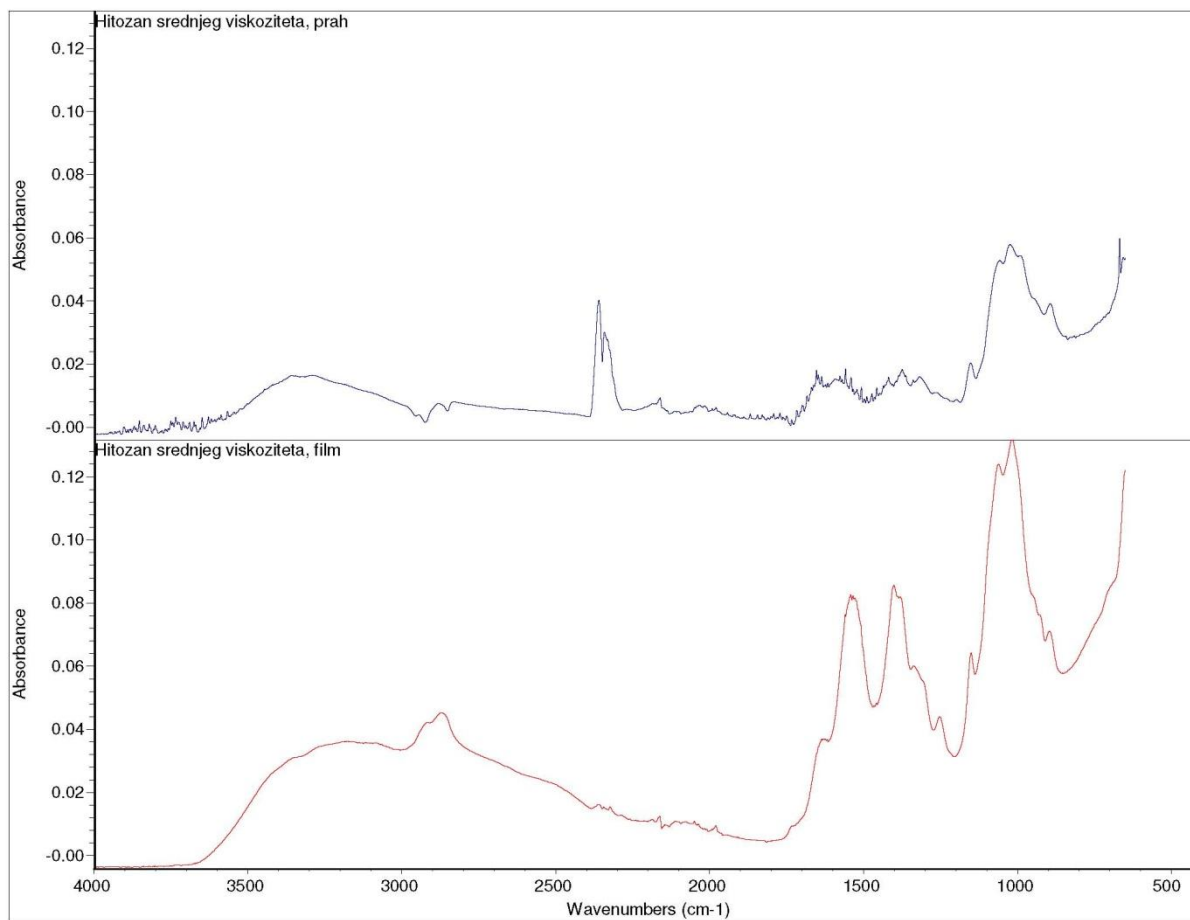


Slika 47. ATR-FTIR spektri nativnih hitozana različitog viskoziteta



**Slika 48. ATR-FTIR spektri nativnog hitozana niskog viskoziteta i biofilma formiranog rastvaranjem ovog hitozana u sirćetnoj kiselini**





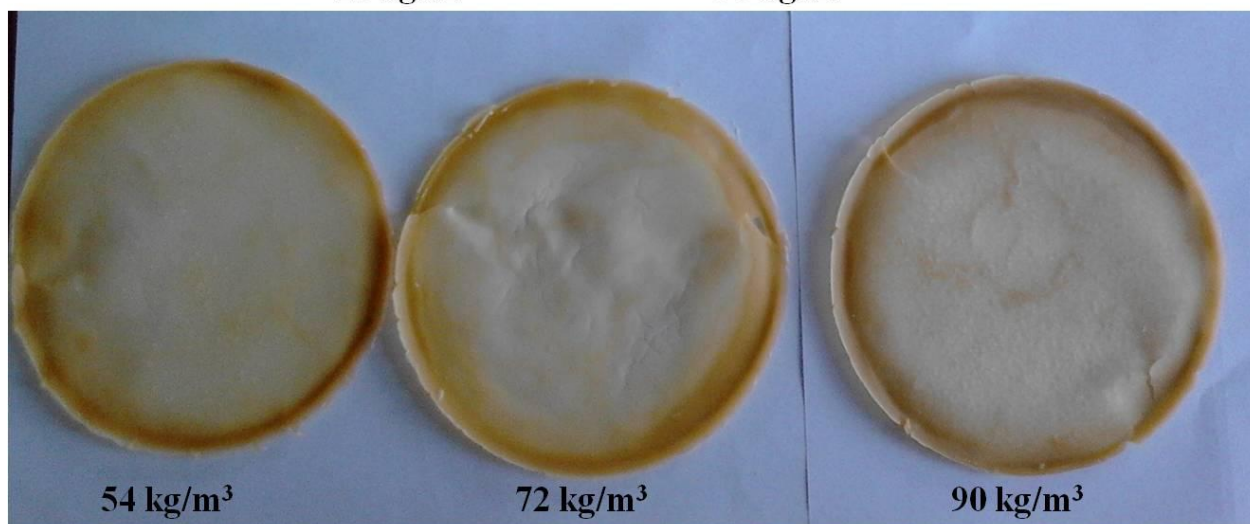
**Slika 49. ATR-FTIR spektri nativnog hitozana srednjeg viskoziteta i biofilma formiranog rastvaranjem ovog hitozana u sirćetnoj kiselini**

**Prilog 2.**



**18 kg/m<sup>3</sup>**

**36 kg/m<sup>3</sup>**



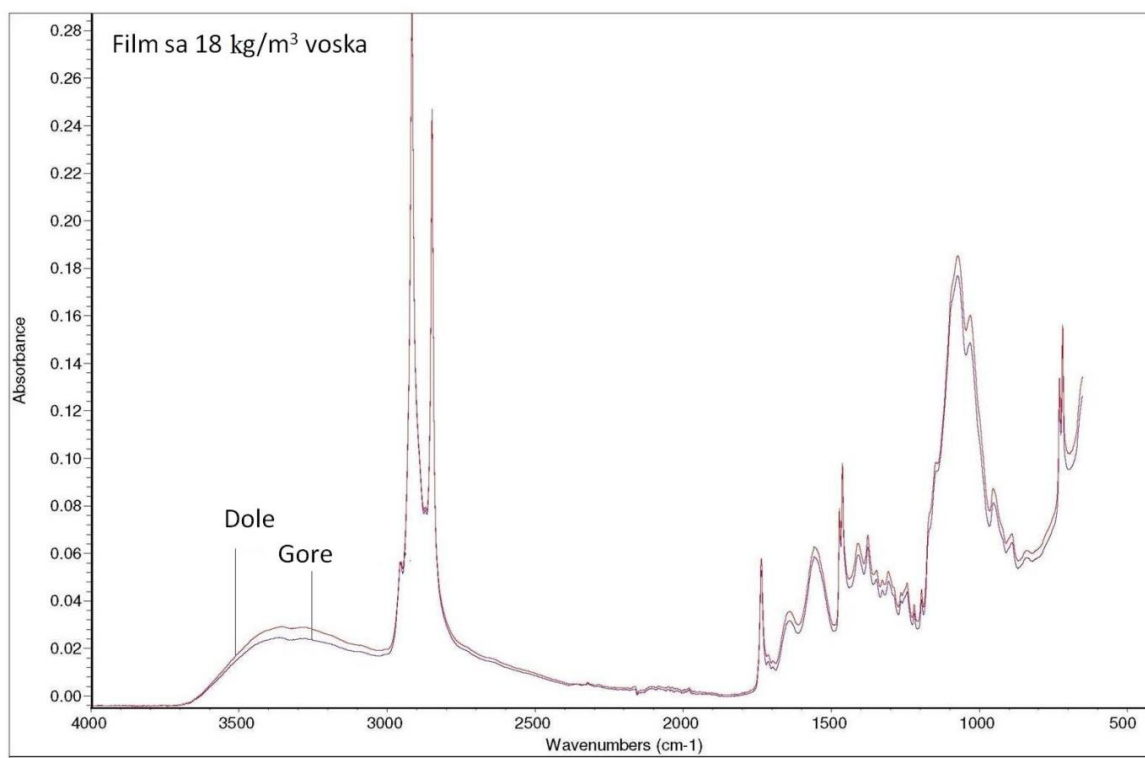
**54 kg/m<sup>3</sup>**

**72 kg/m<sup>3</sup>**

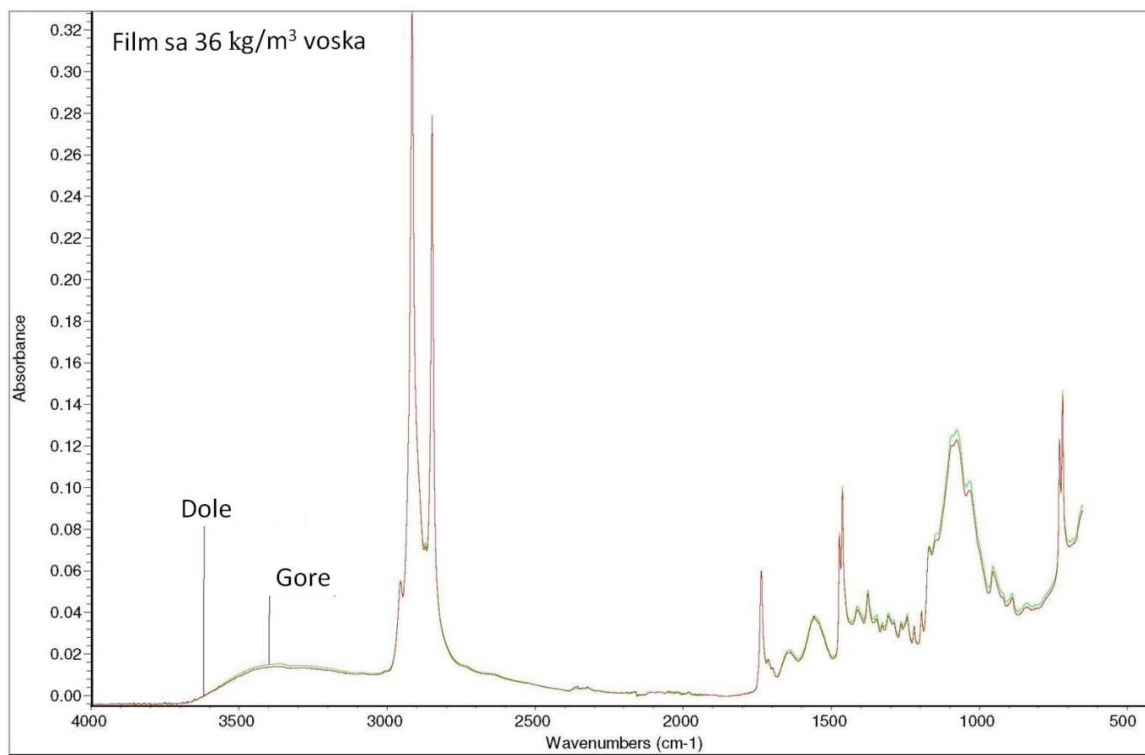
**90 kg/m<sup>3</sup>**

**Slika 50. Hitozanski filmovi sa pčelinjim voskom bez EUK**

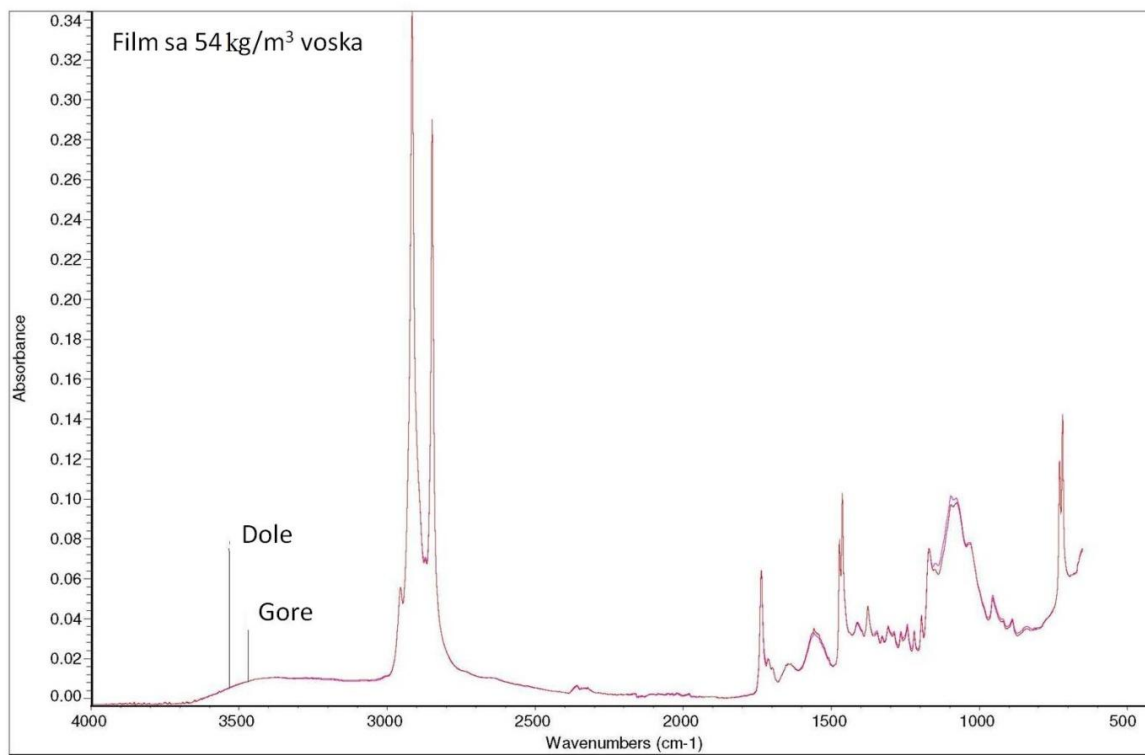
## Prilog 3.



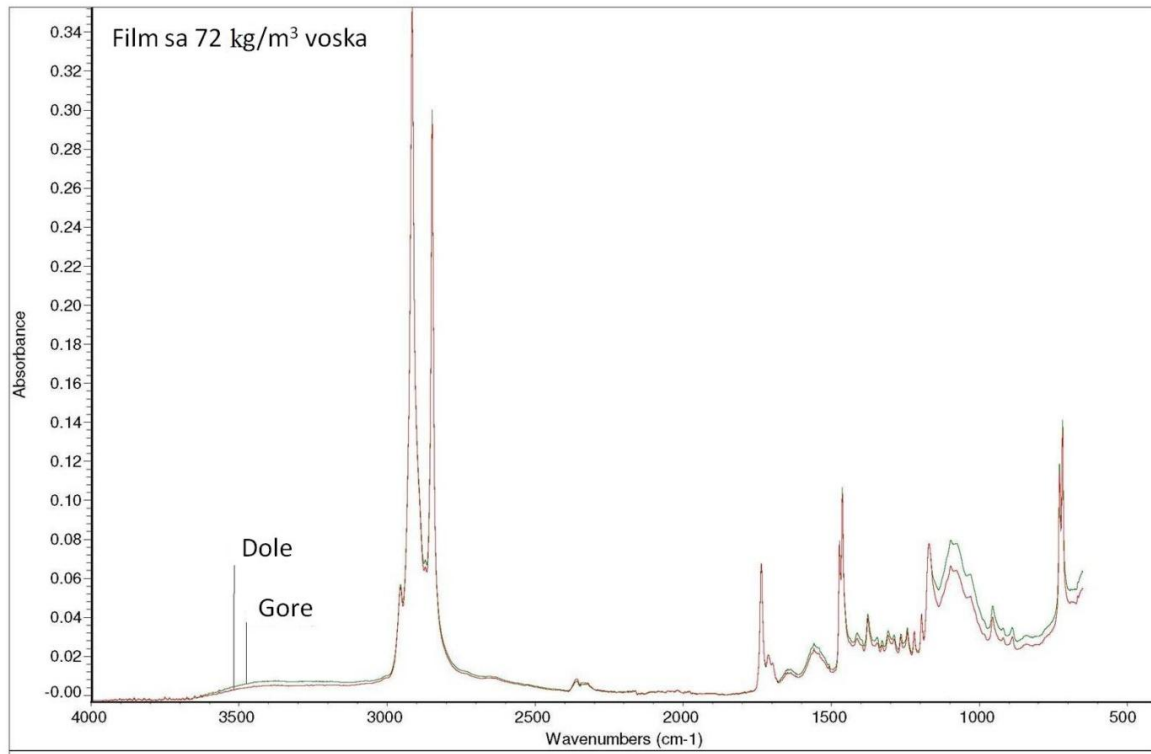
Slika 51. ATR-FTIR spektri gornje i donje površine filma sa 18 kg/m<sup>3</sup> voska



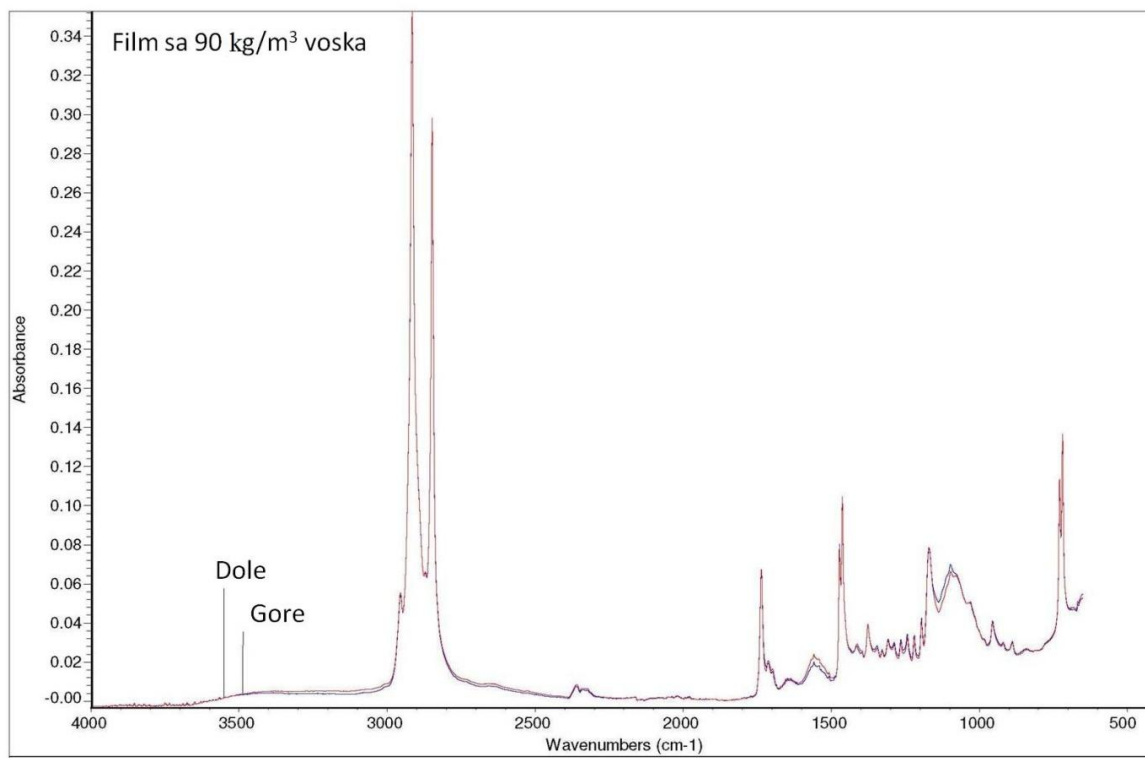
Slika 52. ATR-FTIR spektri gornje i donje površine filma sa 36 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 53. ATR-FTIR spektri gornje i donje površine filma sa 54 kg/m<sup>3</sup> voska



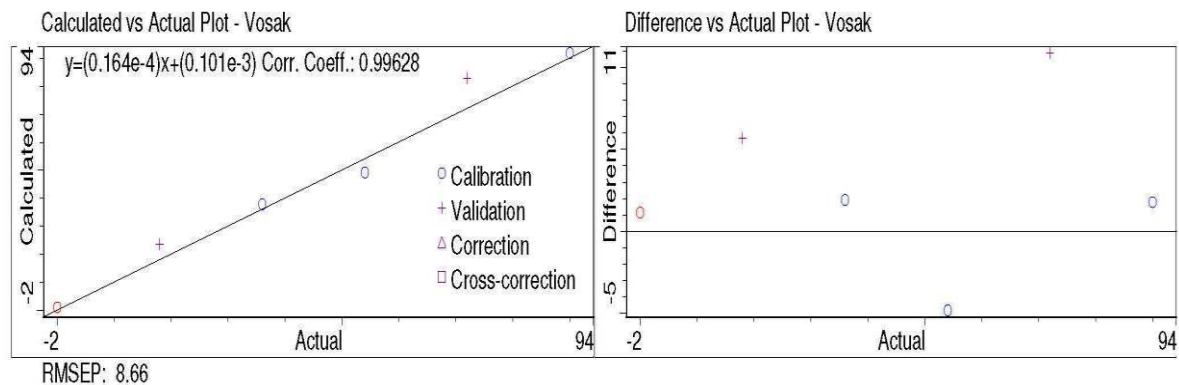
Slika 54. ATR-FTIR spektri gornje i donje površine filma sa 72 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 55. ATR-FTIR spektri gornje i donje površine filma sa 90 kg/m<sup>3</sup> voska

## Prilog 4.

CV C:\My Documents\omnic\Quant\CV lamnakol.qnt  
 Revision: 2 Last saved on: Wed Dec 11 11:14:23 2013  
 Printed on: Tue Mar 31 13:05:18 2015



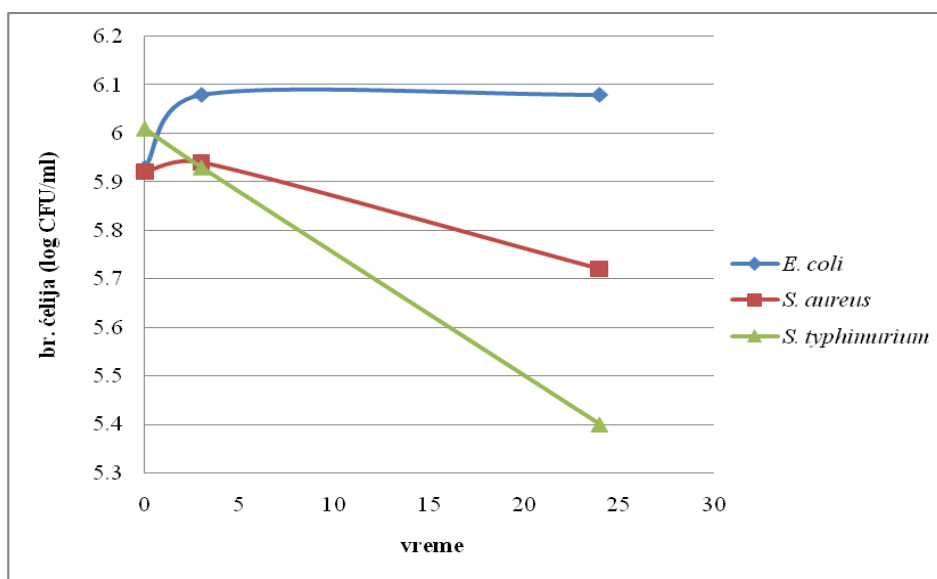
Calibration Results Table - Vosak

Index	Spectrum Title	Usage	Actual	Calculated	Measurement	Diff. x Path
1	0.8% EUK	0	0.00	1.13	0.00012	1.13
2	18 kg/m <sup>3</sup> voska	1	18.00	23.67	0.00049	5.67
3	36 kg/m <sup>3</sup> voska	0	36.00	37.91	0.00072	1.91
4	54 kg/m <sup>3</sup> voska	0	54.00	49.18	0.00091	-4.82
5	72 kg/m <sup>3</sup> voska	1	72.00	82.86	0.00146	10.86
6	90 kg/m <sup>3</sup> voska	0	90.00	91.78	0.00160	1.78

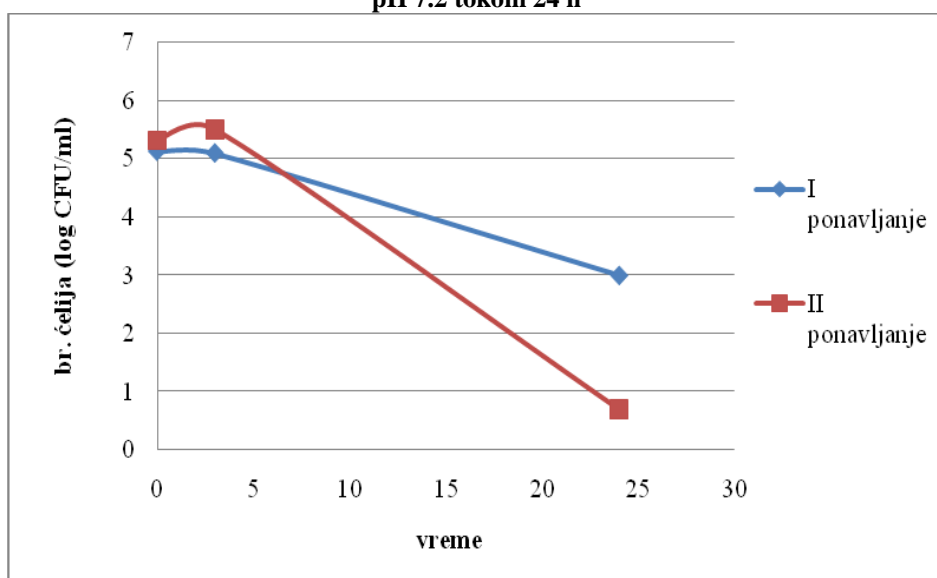
Slika 56. Rezultati uspostavljanja korelacije između ATR-FTIR spektara filmova sa voskom i koncentracije voska uz pomoć programa "TQ analyst"



## Prilog 5.



Grafik 39. Viabilnost ćelija *E. coli*, *S. aureus* i *S. Typhimurium* (log CFU/ml) u 3 mM fosfatnom puferu pH 7.2 tokom 24 h



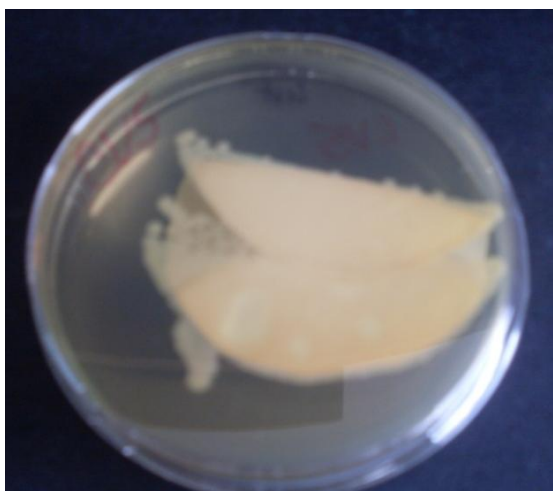
Grafik 40. Viabilnost ćelija *L. monocytogenes* (log CFU/ml) u 3 mM fosfatnom puferu pH 7.2 tokom 24 h



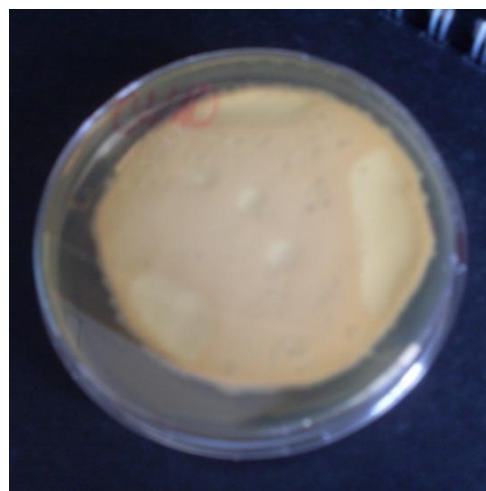
Slika 57. Zone rasta *E. coli* za hitozanski film



Slika 58. Zone rasta *E. coli* za film sa 0.8% EUK



Slika 60. Odsustvo rasta *E. coli* sa filma i ploče za film sa 18 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 59. Odsustvo rasta *E. coli* sa filma i ploče za film sa 36 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 62. Odsustvo rasta *E. coli* sa filma i ploče za film sa 54 kg/m<sup>3</sup> voska



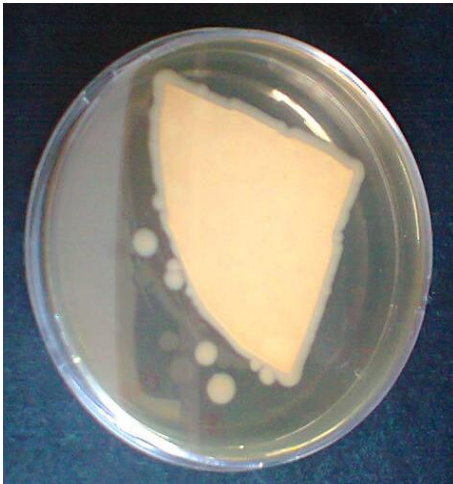
Slika 61. Zone rasta *S. aureus* za hitozanski film



Slika 64. Zone rasta *S. Typhimurium* za hitozanski film



Slika 63. Odsustvo rasta *S. Typhimurium* sa filma sa 18 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 65. Odsustvo rasta *S. Typhimurium* sa filma sa 36 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 66. Odsustvo rasta *S. Typhimurium* sa filma i ploče za film sa 54 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 68. Odsustvo rasta *S. Typhimurium* sa filma sa 72 kg/m<sup>3</sup> voska



Slika 67. Odsustvo rasta *S. Typhimurium* sa filma sa 90 kg/m<sup>3</sup> voska