

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Gordana D. Jovanović

ISPITIVANJE ANTIMIKROBNIH OSOBINA  
HITAZANA NA RAST *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* U POVRĆU

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Gordana D. Jovanović

ISPITIVANJE ANTIMIKROBNIH OSOBINA  
HITAZANA NA RAST *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* U POVRĆU

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Gordana D. Jovanović

TESTING OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES  
OF CHITOSAN ON GROWTH OF *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* IN VEGETABLES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Komisija za odbranu i ocenu

Mentor:

dr Anita Klaus, docent, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, uža naučna oblast Tehnološka mikrobiologija

Članovi komisije:

dr Miomir Nikšić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, uža naučna oblast Tehnološka mikrobiologija

dr Dragoslava Radin, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, uža naučna oblast Tehnološka mikrobiologija

dr Branislav Zlatković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, uža naučna oblast Nauka o konzervisanju

dr Vera Katić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, uža naučna oblast Higijena i tehnologija mleka

Datum odbrane:

## **Ispitivanje antimikrobnih osobina hitozana na rast *Listeria monocytogenes* u povrću**

### REZIME

Zadatak ove doktorske disertacije bio je da se utvrdi antimikrobna aktivnost hitozana u formi omotača i filmova na sojeve *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 i *Listeria monocytogenes* ATCC19115 u sveže sečenom, minimalno prerađenom povrću. Antimikrobna svojstva hitozana analizirana su u različitim vrstama hrane kao što su sveže sečeno povrće: kupus, šargarepa i crna rotkva ali i majonez, koji se često koristi za pripremu salata sa povrćem. Osim antimikrobne aktivnosti hitozana, ispitivan je uticaj filmova hitozana na promenu pH vrednosti, sadržaj rastvorljive suve materije i senzorne karakteristike ispitivanog povrća.

U cilju realizacije postavljenih zadataka izrađeni su različiti modeli omotača i filmova sa hitozanom. Omotači hitozana su pripremljeni sa mlečnom ili sirćetnom kiselinom tako da je ukupna koncentracija hitozana u njima iznosila 0,25%; 0,5% ili 1%. Filmovi hitozana su pripremljeni sa dodatkom želatina tako da je u njima postignuta konačna koncentracija od 0,5%; 1% i 2% hitozana. U cilju poboljšanja antimikrobne aktivnosti u filmove je dodato etarsko ulje mente ili timijana u koncentraciji od 0,1% i 0,2%. Odabir ovih ulja izvršen je na osnovu rezultata ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja koja su pokazala da etarska ulja timijana i mente imaju najefikasnije dejstvo na testirane bakterijske sojeve.

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da testirani sojevi bakterija imaju različitu sposobnost preživljavanja na ispitivanim vrstama povrća. Najveća inhibicija rasta ispitivanih bakterijskih sojeva postignuta je kod crne rotkve i šargarepe. Sam kupus ne ispoljava inhibitorni efekat na rast ispitivanih bakterija, već značajno doprinosi razvoju ovih bakterija. Antimikrobna aktivnost omotača hitozana zavisi od upotrebene koncentracije hitozana, vrste organske kiseline koja je upotrebljena kao rastvarač, kao i od vrste povrća u kome se omotači primenjuju. Najizraženija inhibicija bakterijskih sojeva postignuta je u crnoj rotkvi i šargarepi, sa 1% omotačima hitozana koji su pripremljeni sa sirćetnom kiselinom.

Svi primenjeni filmovi hitozana ispoljili su odgovarajuću aktivnost na ispitivane bakterijske sojeve. Antimikrobna aktivnost filmova hitozana povećava se sa porastom upotrebljene koncentracije hitozana, pri čemu 1% film hitozana ima izraženije antimikrobno dejstvo nego 0,5% film hitozana. Međutim, zapaženo je da 2% film hitozana ima slabiju antimikrobnu aktivnost od 1% filma hitozana što se može objasniti veoma visokim viskozitetom 2% filma hitozana. Osim toga, u svim primenjenim formulacijama filmova hitozana, rezultati su pokazali da dodatak etarskog ulja timijana u koncentraciji od 0,2% značajno poboljšava antimikrobnu aktivnost upotrebljenog filma i skraćuje vreme koje je potrebno za inhibiciju bakterija u povrću.

Osim izražene antimikrobne aktivnosti, filmovi hitozana ispoljavaju značajan uticaj i na pH vrednost i sadržaj rastvorljive suve materije skladištenog povrća. Najveća promena pH vrednosti u povrću uočava se nakon prvih 24h skladištenja. Dobijene pH vrednosti u povrću ne podležu značajnijim promenama tokom celog perioda skladištenja, što ukazuje da primenjeni filmovi hitozana mogu doprineti očuvanju kvaliteta minimalno prerađenog, sveže sečenog povrća. Najizraženije ukupno smanjenje pH, u odnosu na početnu vrednost, zabeleženo je u prisustvu 0,5% filma hitozana, a iznosilo je 28,4% kod kupusa i šargarepe, odnosno 28,2% kod rotkve. Svi uzorci povrća koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana imali su veći sadržaj šećera u odnosu na netretirano povrće. Ipak, nije uočena značajna razlika kod povrća koje je skladišteno u prisustvu filmova sa različitim koncentracijama hitozana.

Rezultati senzorne analize pokazuju da svi uzorci povrća koji su skladišteni u prisustvu 0,5% i 1% filmova hitozana, ispoljavaju poboljšanje ukusa i mirisa, i bili su dobro prihvaćeni od strane ocenjivača. Najveće promene ukusa i mirisa, konstatovane su u uzorcima povrća koji su skladišteni u prisustvu filmova sa dodatkom etarskih ulja. Etarsko ulje mente pozitivno se odražava na senzorna svojstva povrća dok je etarsko ulje timijana, bez obzira na upotrebljenu koncentraciju, bilo potpuno neprihvatljivo za potrošače.

Rezultati u okviru ove disertacije ukazuju na postojanje razlika između ispitivanih bakterijskih sojeva u osetljivosti prema hitozanu i različitim vrstama antimikrobnih supstanci iz povrća i etarskih ulja. Dobijeni rezultati mogu naći primenu u izradi

funkcionalne ambalaže za očuvanje kvaliteta minimalno prerađenog, sveže sečenog povrća i salata.

**Ključne reči:** minimalno prerađeno povrće, *Listeria monocytogenes*, antimikrobna svojstva hitozana, omotači i filmovi hitozana, etarska ulja.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK:

## **Testing of antimicrobial properties of chitosan on growth of *Listeria monocytogenes* in vegetables**

### **ABSTRACT**

The objective of this doctoral thesis was to determine the antimicrobial activity of chitosan in the form of coatings and films against the strains of *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 in fresh-cut, minimally processed vegetables. The antimicrobial properties of chitosan were analyzed in different types of food such as fresh cut vegetables: cabbage, carrot and black radish and mayonnaise, which is often used to prepare the salad with vegetables. In addition to the antimicrobial activity of chitosan, the influence of chitosan films on pH changes, content of soluble solids and sensory properties of tested vegetables, have been investigated.

In order to realize of given tasks, different coatings and films with the chitosan were made. Chitosan coatings were prepared with lactic or acetic acid, so that the total concentrations of chitosan coatings have been 0.25%; 0.5% or 1%. Films of chitosan were prepared with the addition of gelatin and final concentrations of chitosan have been 0.5%; 1% and 2%. In order to improve the antimicrobial activity of the films, essential oil of mint or thyme in a concentration of 0.1% and 0.2% were added. The choice of these oils was made on the basis of the antimicrobial activity of thyme and mint essential oils which have been shown as the most effective against the tested bacterial strains.

The analysis of the results showed that the tested strains of bacteria have different viability in the tested types of vegetables. The highest growth inhibition of tested bacterial strains was achieved in the black radish and carrots. Cabbage alone does not exhibit an inhibitory effect on growth of the bacteria, but also significantly contributes to the development of these bacteria. Antimicrobial activity of chitosan coatings depends on the concentration of chitosan used, type of organic acid which is used as a solvent, and the type of vegetable in which the coatings were applied. The highest inhibition of growth of bacterial strains was obtained with black radish and carrot, with 1% of chitosan coatings, which have been prepared with acetic acid.

All applied films of chitosan exhibited the appropriate action on tested bacterial strains. Antimicrobial activity of chitosan film increases with increasing concentrations of



applied chitosan, where 1% chitosan film has the highest antimicrobial activity compared to 0.5% chitosan film. However, it was observed that 2% chitosan film has lower antimicrobial activity than 1% chitosan film, which can be explained by a very high viscosity of 2% chitosan film. In addition, in all applied formulations of chitosan films, results showed that the addition of thyme essential oils in a concentration of 0.2% significantly improves the activity of the antimicrobial film and reduce the time required for the inhibition of bacteria in vegetables.

Besides expressed antimicrobial activity, a chitosan film exerts a significant influence on the pH value and content of soluble solids of stored vegetables. The biggest change in the pH value of vegetables is observed after the first 24 hours of storage. Realized pH values in vegetables are not subjected to significant changes during the entire storage period, which indicates that the applied films of chitosan can contribute to preserving the quality of minimally processed, fresh-cut vegetables. The most pronounced reduction of pH, compared to the initial value, was observed in the presence of 0.5% chitosan film, and amounted to 28.4% in cabbage and carrots, or 28.2% of radish. All samples of vegetables that are stored in the presence of chitosan film had a higher sugar content compared to untreated vegetables. However, there is no significant difference in vegetables that has been stored in the presence of films with different concentrations of chitosan.

The results of sensory analysis showed that all samples of vegetables that are stored in the presence of 0.5% and 1% chitosan films, exhibit the improvement of taste and odour, and were well accepted by panelist. The biggest change in taste and odor, were found in samples of vegetables that are stored in the presence of films with the addition of essential oils. The mint essential oil had a positive effect on the sensory properties of vegetables, while the thyme essential oil, regardless on the used concentration, was totally unacceptable to consumers.

Results from this thesis indicated out the differences between the tested bacterial strains in susceptibility to different types of chitosan and antimicrobial substances of vegetable and essential oils. The obtained results can be applied in the preparation of

functional packaging to preserve the quality of minimally processed, fresh-cut vegetables and salads.

**Key words:** minimally processed vegetables, *Listeria monocytogenes*, antimicrobial properties of chitosan, chitosan coatings and films, essential oils.

Scientific area: Technological engineering

Special topics: Industrial microbiology

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Značaj voća i povrća u ishrani	3
2.2. Povrće kao izvor mikroorganizama	10
2.2.1. Sveže sečeno, minimalno prerađeno voće i povrće	14
2.3. Jestiva ambalaža	17
2.3.1. Filmovi na bazi želatina	22
2.3.2. Filmovi na bazi hitozana	25
2.3.3. Filmovi na bazi proteina i polisaharida	39
2.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	39
2.4.1. Morfološke i fiziološke karakteristike <i>L. monocytogenes</i>	41
2.4.2. Izolovanje i identifikacija <i>L. monocytogenes</i>	42
2.4.3. Rasprostranjenost <i>L. monocytogenes</i>	44
2.4.4. Patogenost <i>L. monocytogenes</i>	46
2.4.5. Uticaj temperature na rast <i>L. monocytogenes</i>	50
2.4.6. Uticaj pH vrednosti na rast <i>L. monocytogenes</i>	52
2.4.7. Uticaj aw vrednosti na rast <i>L. monocytogenes</i>	53
2.4.8. Uticaj etarskih ulja na rast <i>L. monocytogenes</i>	54
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	59
4. MATERIJAL I METODE	61
4.1. Materijal	61
4.2. Metode	62
5. REZULTATI	69
5.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja	69
5.2. Sposobnost rasta sojeva <i>L. monocytogenes</i> u povrću	73
5.2.1. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na kupusu i šargarepi	73

5.2.2. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na šargarepi i rotkvi	78
5.3. Sposobnost rasta sojeva <i>L. monocytogenes</i> u povrću u prisustvu omotača hitozana	83
5.3.1. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na rotkvi u prisustvu omotača hitozana	83
5.3.2. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na šargarepi u prisustvu omotača hitozana	88
5.3.3. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na kupusu u prisustvu omotača hitozana	93
5.4. Sposobnost rasta sojeva <i>L. monocytogenes</i> u povrću u prisustvu kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	97
5.4.1. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na rotkvi u prisustvu 0,5% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	97
5.4.2. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na rotkvi u prisustvu 1% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	102
5.4.3. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na šargarepi u prisustvu 0,5% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	106
5.4.4. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na šargarepi u prisustvu 1% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	111
5.4.5. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na šargarepi u prisustvu 2% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	115
5.4.6. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na kupusu u prisustvu 0,5% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	118
5.4.7. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na kupusu u prisustvu 1% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	123
5.4.8. Sposobnost rasta <i>L. monocytogenes</i> na kupusu u prisustvu 2% kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja	128
5.5. Preživljavanje sojeva <i>L. monocytogenes</i> u majonezu	132
5.6. Uticaj filmova hitozana na pH vrednost povrća	134
5.7. Uticaj različitih koncentracija filmova hitozana	

na sadržaj suve materije povrća	137
5.8. Senzorna analiza	138
6. DISKUSIJA	142
7. ZAKLJUČCI	154
8. LITERATURA	157
Biografija	
Izjave	

## 1. UVOD

Sveže sečeno povrće predstavlja plodove povrća koji su oprani, oljušteni, isečeni i upakovani u odgovarajuću ambalažu. Ovakav proizvod je odmah spreman za upotrebu. Zbog minimalne prerade, sveže sečeno povrće je veoma osetljivo na kontaminaciju mikroorganizmima, enzimatsko potamnivanje, promene teksture, gubitak ukusa i mirisa i propadanje. Da bi se ove promene svele na minimum, sveže sečeni proizvodi se čuvaju na niskim temperaturama. Najčešće se na domaćem tržištu od sveže sečenog povrća može naći kupus i šargarepa, pojedinačno ili u mešavini, uz dodatak radiča, zelene salate ili praziluka. U ovakvom obliku, povrće je dostupno potrošačima tokom cele godine usled čega je prevaziđen sezonski karakter snabdevanja potrošača svežim povrćem.

Povrće zbog svog načina uzgoja može biti kontaminirano različitim mikroorganizmima od kojih su za zdravstvenu ispravnost hrane svakako najznačajniji patogeni mikroorganizmi kao uzročnici različitih oboljenja. Jedan od patogenih mikroorganizama koji se poslednjih godina često povezuje sa svežim povrćem i salatama jeste *Listeria monocytogenes*. Konzumiranjem hrane koja je kontaminirana ovom bakterijom kod ljudi nastaje oboljenje pod nazivom listerioza. Pored različitih kliničkih manifestacija, listerioza se karakteriše i visokom stopom smrtnosti, koja kod osetljive populacije može biti veća i od 20%. Iz tih razloga ova patogena bakterija predstavlja značajan rizik za zdravlje potrošača.

*Listeria monocytogenes* se može naći u sveže sečenom povrću kao posledica kontaminacije povrća u toku njegovog uzgoja, loših higijensko sanitarnih uslova prilikom prerade povrća, ili unakrsne kontaminacije u toku sečenja, mešanja i pakovanja ovih proizvoda. Niske temperature koje se primenjuju za čuvanje sveže sečenog povrća nisu u mogućnosti da spreče razviće ove bakterije jer se ona karakteriše sposobnošću rasta na temperaturi od 4 °C. Pošto se sveže sečeno povrće konzumira pre svega u svežem obliku, postoji i opravdan rizik od nastanka oboljenja izazvanih ovom patogenom bakterijom. Zbog toga je zdravstvena bezbednost sečenog i minimalno prerađenog povrća od bitnog značaja za javno zdravlje jer se u današnje vreme konzumiranje povrća promoviše širom sveta kao jedna od nezamenljivih komponenata zdravog života.

Da bi se sprečila pojava oboljenja izazvanih bakterijom *Listeria monocytogenes*, jedna od pogodnih metoda za produženje roka trajanja sveže sečenog povrća i salata jeste i upotreba jestivih filmova. Jestivi i/ili biorazgradivi filmovi se proučavaju u cilju primene za pakovanje hrane i farmaceutskih proizvoda, zbog njihove mogućnosti da štite proizvod od kontaminacije, da u sebi nose aktivne komponente – enzime, antimikrobne i antioksidantne agense, pojačivače ukusa i mirisa i da zadrže mehanički integritet upakovanog sadržaja. U odnosu na konvencionalne nejestive polimere, imaju brojne prednosti, zbog njihove biorazgradivosti i sve više nalaze praktičnu primenu u pakovanju hrane i produženju njenog roka trajanja, ali i u farmaceutskoj industriji i dr.

Jestivi i/ili biorazgradivi filmovi se mogu proizvesti od različitih polimera ili kombinacijom dva ili više polimera. Takvi filmovi mogu biti kompozitni ili laminatni, dobijeni iz smeše više polimera ili laminiranjem jednog polimera drugim. Prilikom formiranja kompozitnih biofilmova najčešće dolazi do interakcija protein-protein ili protein-polisaharidi.

Veliki broj istraživanja je posvećen formiranju filmova od različitih proteina i polisaharida i ocenjivanju svojstava dobijenih kompozitnih filmova. Jedan od perspektivnih načina za pakovanje hrane je upotreba filmova na bazi hitozana i želatina.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Značaj voća i povrća u ishrani

Voće i povrće predstavlja glavni izvor makro i mikro nutrijenata zbog čega ima značajnu ulogu u ljudskoj ishrani i zdravlju. Od makro nutrijenata, najznačajniji sastojci voća i povrća su ugljeni hidrati i biljna vlakna, dok su od mikro nutrijenata najznačajniji vitamini, minerali kao i polifenoli, karotenoidi i glukozinolati (Barrett et al. 2010). Od vitamina, u voću i povrću najviše su zastupljeni vitamin C, tiamin, niacin, piridoksin i folna kiselina.

Poznato je da pored vitamina, voće i povrće može biti veoma dobar izvor magnezijuma, gvožđa, kalijuma, kalcijuma, cinka i fosfora. Fitohemikalije iz voća i povrća su jaki antioksidansi i mogu imati antikancerogeno dejstvo (Wargovich, 2000). Pošto antioksidantni kapacitet varira u zavisnosti od vrste voća i povrća, preporučuje se da se u ishrani svakodnevno koriste raznovrsne vrste svežeg voća i povrća. USDA (2000) podstiče potrošače da konzumiraju najmanje dve porcije voća i bar tri porcije povrća dnevno. Pri tom treba birati sveže voće i povrće, raznih boja i oblika a najpoželjnije je tamno zeleno, lisnato povrće, narandžasto i crveno voće i povrće. Takođe, treba napomenuti da se pojedini sastojci iz svežeg voća i povrća mogu mnogo lakše usvojiti i iskoristiti iz hrane nego iz različitih dodataka ishrani i dijetetskih proizvoda. Povećana potrošnja svežeg voća i povrća bogatog karotenoidima pruža bolje zaštitno dejstvo na povećanu LDL oksidaciju, od karotenoidnih dijetetskih suplemenata (Southon, 2000; Seifried et al., 2003). Visoka potrošnja paradajza i proizvoda na bazi paradajza je povezana sa smanjenom pojavom raka prostate. Prema podacima Giovannucci et al. (2002), glavni razlog za ovakav učinak ima likopen koji paradajzu daje crvenu boju. I Boileau et al. (2003), su uočili da upotreba paradajz praha u ishrani značajno utiče na smanjenje pojave raka kod pacova. Voće i povrće koje se preporučuje da se svakodnevno konzumira je spanać, narandžasto voće, mango, šargarepa, dinja, ananas, crveni grejpfrut itd.

Na osnovu brojnih naučnih podataka može se tvrditi da adekvatan unos voća i povrća predstavlja važan deo zdrave ishrane. Nedovoljan unos voća i povrća u ishrani predstavlja faktor rizika za hronične bolesti kao što su rak, koronarne bolesti srca, moždani



udar i nastanak katarakte (Van Duyn i Pivonka, 2000). Naučni dokazi pokazuju da učestalo konzumiranje voća i povrća može sprečiti oboljenja jednjaka, želuca, pankreasa, bešike kao i da ishrana bogata voćem i povrćem može sprečiti 20% od većine vrsta raka (Oguntibeju et al., 2013).

Jedna od bitnih karakteristika voća i povrća koja proističe iz njihovog hemijskog sastava je niska energetska vrednost usled čega se ovi plodovi često sreću kao neizostavni sastojak različitih dijeta. Prema podacima Tohill et al. (2004), povećan unos voća i povrća ima pozitivan efekat na smanjenje telesne težine i prevenciju gojaznosti.

Najveću biološku i hranjivu vrednost ima sveže povrće, prvenstveno zbog izvora vitamina, minerala i biljnih vlakana. Zbog toga potrošači očekuju da povrće koje kupuju bude dobar izvor ovih sastojaka. Nažalost, potrošači ne mogu razlikovati da li plodovi imaju visok ili nizak sadržaj ovih važnih sastojaka. Mnogi faktori utiču na sadržaj hranljivih sastojaka povrća, kao što su uslovi i način gajenja, stepen zrelosti i uslovi čuvanja nakon berbe. Tokom čuvanja nastaju manje promene u dijetalnim vlaknima i sadržaju minerala ali je mnogo veći gubitak vitamina. Pored toga, sečenje pri proizvodnji minimalno prerađenog povrća, utiče na povećanu proizvodnju etilena što opet povećava respiraciju i gubitak pojedinih vitamina. Jedan od vitamina koji se najbrže degradira je vitamin C i ima podataka da je ovaj vitamin naročito nestabilan u povrću kao što je asparagus (Saito et al., 2000) i dinje (Gil et al., 2006; Beaulieu i Lea, 2007)

Može se reći da svakodnevna upotreba povrća u ishrani, naročito u svežem stanju, predstavlja životnu potrebu čoveka. Savremena nauka o ishrani smatra da je neophodno da dnevni obrok čoveka obuhvata 400 - 500g raznovrsnog svežeg povrća.

Zbog toga što se neki sastojci u povrću razgrađuju prilikom termičkog tretmana, preporučuje se da se povrće konzumira u svežem obliku i to najčešće u vidu svežih salata. Salata se koristi obično uz obrok, ali može biti i samostalni obrok. Salata poboljšava apetit i dugo održava sitost zbog prisustva različitih biljnih vlakana. Pošto sadrži veoma malo kalorija pogodna je za gojazne osobe i dijetalnu ishranu.

Salata se može pripremiti kao jednostavna i mešana salata. Jednostavne salate se pripremaju od jedne vrste povrća pri čemu se mogu koristiti listovi zelene salate, kupus, krastavac, paradajz, rotkva, cvekla itd. Mešane salate predstavljaju kombinaciju ili

mešavinu više različitih vrsta povrća. U pripremi mešanih salata mogu se dodati i različiti začini kao što su jabukovo ili vinsko sirće, bosiljak, peršun, origano i so, pri čemu se postiže poboljšanje ukusa i mirisa ali i lekovitost salata. Prilikom pripreme mešanih salata, treba koristiti različite vrste povrća koje svojim šarenilom i raznobojnim spektrom doprinose većem gastronomskom uživanju u hrani. Za pripremu mešanih salata mogu se koristiti različite kombinacije kupusa, šargarepe, praziluka, celera, rotkve, paradajza, krastavca itd.

Pošto je u ovom radu kao eksperimentalni materijal upotrebljen kupus, šargarepa i crna rotkva, u ovom delu biće predstavljene neke osnovne karakteristike i značaj ovih vrsta povrća u ishrani.

**Rotkva** (*Raphanus sativus* L.) pripada porodici *Cruciferae* i gaji se zbog svog jestivog, mesnatog korena. Koren se može konzumirati sirov, kuvan ili usoljen. To je dvogodišnja biljka veličine repe, sa crnom kožom i belim unutrašnjim delom. Potiče iz Srednje Azije, a smatra se da je jedna od najstarijih kultivisanih biljaka u svetu. Gajila se u starom Egiptu još 2700 godina p.n.e., a u Kini postoje podaci o njenom gajenju 400 godina pre Hrista. Gajili su je Grci i Rimljani, a širenjem Rimskog carstva proširila se u srednju Evropu. Kod nas se više gaji u kontinentalnom području, u kućnim baštama, a za tržište u prigradskim porodičnim gazdinstvima.

U našoj narodnoj kuhinji, rotkva se često koristi kao zimska salata. Naribani, sveži koren, začinjjen sirćetom i uljem, cení se kao lokalni specijalitet. Može se koristiti kao samostalna salata ili u kombinaciji sa drugim povrćem i voćem kao što su šargarepa, kupus, jabuka itd. Pikantan ukus i specifičan miris rotkve potiče od etarskih ulja, kojih ima 11,5 do 24,5 mg/100 g jestivog dela, a ljutinu joj daje 4-metiltio-3-butenil izotiocianat koji ima antimikrobnú i antimutagenu aktivnost (Strack et al., 1985; Caceres, 1987). Pored toga, rotkva sadrži sulforafen i rafanin, koji predstavljaju glavne sumporne komponente. Prema literaturnim podacima, Singh i Singh (2013), sulforafen pokazuje izrazitu antimikrobnú aktivnost protiv *Streptococcus sp.*, *Pneumococcus sp.* i *Escherichia coli*. Rafanin ispoljava veoma snažnu antibakterijsku aktivnost i efikasan je protiv gram pozitivnih i gram negativnih mikroorganizama (Abdou, 1972). Osim toga rafanin je aktivan i protiv nekih patogenih i truležnih bakterija kao što su *Listeria sp.*, *Micrococcus sp.*, *Enterococcus sp.*,

*Lactobacillus sp.* i *Pedicoccus sp.* Neki autori smatraju da baktericidno dejstvo rotkve potiče od prisutnih etarskih ulja i lizozima (Anonymous, 2012). Takođe je dobro poznata i antimikrobna aktivnost soka rotkve protiv bakterija *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli* (Watal et al., 2011). Alkoholni i vodeni ekstrakt rotkve takođe pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv *Streptococcus mutans* i *Candida albicans*. Vodeni ekstrakt cele biljke pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv *Sarcina lutea* i *Staphylococcus epidermis* (Caceres, 1987) dok vodeni ekstrakt lišća rotkve pokazuje značajnu antivirusnu aktivnost protiv izazivača gripa, a vodeni ekstrakt korena rotkve ima antimutagenu aktivnost protiv *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 100.

Približno, rotkva ima 3,4 % ugljenih hidrata, 0,68 % proteina, 0,1 % masti i 1,6 % biljnih vlakana (Anonymous, 2009). Pored toga, rotkva je bogat izvor važnih minerala kao što su kalijum, kalcijum, gvožđe, fosfor, sumpor i mangan ali sadrži i tragove elemenata kao što su aluminijum, barijum, litijum, mangan, fluor i jod (Singh i Singh, 2013).

Zdravstvenu vrednost crne rotkve narod je prepoznao još u davna vremena, pa postoje mnogi domaći preparati za lečenje prehlada, kašlja, za poboljšanje izlučivanja žuči i poboljšanje otpornosti organizma. Zbog ljutine, sok rotkve se, obično, priprema s medom.

Narodna medicina crnu rotkvu najčešće preporučuje kao lek za disajne organe, jetru, bešiku i žuč (Singh i Singh, 2013). Poznato je da rotkva podstiče proizvodnju žuči, povećava protok u žučnoj kesi, ispira i razlaže nagomilani kamenac u žučnoj kesi (Anonymous, 2012).

Blagotvorno deluje na probavne organe, otvara apetit, okrepljuje, podstiče rad disajnih organa i bronhija, leči oboljenje žuči i žučne puteve, koristi se protiv pojave peska i kamenca u žuči, bolesti bubrega, za izbacivanje kamena iz mokraćne bešike, leči katar creva, proliv, skorbut, reumu, išijas, promuklost, kašalj, opadanje kose, koristi se za čišćenje rana i kao diuretik (Ghayur i Gilani, 2007).

U ishrani se crna rotkva najčešće upotrebljava kao salata. Da bi sačuvala svoja lekovita svojstva, ne treba je ni malo soliti. Osobe koje imaju problema sa bubrezima, kao i

oni sa čišćenjem na želucu ili dvanaestopalačnom crevu, ne bi trebali da upotrebljavaju sok od crne rotkve. Seme crne rotkve upotrebljava se za lečenje gljivičnih oboljenja kože.



**Slika 1. Crna rotkva (*Raphanus sativus var. niger*)**

Crna rotkva se preporučuje za čišćenja organizma od toksina, posebno jetre i želuca. Zahvaljujući obilju nesvarljivih ugljenih hidrata, olakšava varenje, a tečnost iz sočnog korena umiruje čitav digestivni sistem. Reguliše rad urinarnog trakta i bubrega. Prisustvo rafanina u crnoj rotkvi omogućava održavanje ravnoteže hormona štitne žlezde u organizmu zbog čega se ovo povrće u nekim zemljama koristi u prevenciji bolesti štitne žlezde (Anonymous, 2012).

Crna rotkva se pokazala kao veoma korisna u tretmanima za smanjenje telesne težine jer veoma lako i brzo pruža osećaj sitosti, a nema mnogo kalorija. Pored toga, sadrži veće količine tečnosti, koja dodatno ubrzava metabolizam.

Može se reći da se rotkva veoma često predlaže i kao alternativa u lečenju oboljenja kao što su rak, AIDS, poremećaj imuniteta itd (Singh i Singh, 2013), za prevenciju kardiovaskularnih oboljenja i sprečavanje starenja organizma (Jin i Kyung, 2001).

**Šargarepa** (*Daucus carota var. sativus*) je dvogodišnja povrtarska biljka iz porodice *Apiaceae* koja potiče iz Mediterana. Po značaju, spada među najvažnije vrste povrća, zajedno sa kupusom, lukom, paradajzom, paprikom, graškom, boranijom, zelenom salatom i krastavcem.

U Srbiju je dospela iz Mađarske, pa otuda i nosi naziv šargarepa (mađarski šargarepa – žuta repa). Gaji se zbog zadebljalog korena narandžaste boje, koji može biti vretenast, cilindričan ili konusan, čak i loptast, što zavisi od sorte i uslova gajenja. Šargarepa je hranljivo i lekovito povrće, a pritom predstavlja veoma bogat izvor vitamina

A. U ishrani se koristi kao sveže, kuvano, sušeno ili kiselo povrće, često i kao sirovina za proizvodnju sokova.

Poznato je da se redovnim uzimanjem šargarepe u ishrani može sprečiti pojava mnogih oboljenja. Ona sadrži osnovne sastojke potrebne za rast, razvoj i jačanje organizma, čuva i poboljšava vid, sprečava anemiju, gorušicu, poboljšava varenje, olakšava izlučivanje mokraćne, sprečava opadanje kose, pomaže u lečenju reume, gihta, upale krajnika, bolesti disajnih organa, rana i opekotina, pročišćava krv i odstranjuje otrovne materije iz organizma, otklanja umor od umnog rada i može bitno pojačati koncentraciju (Abdulaali, 2009). Prema nekim autorima, šargarepa se može koristiti za lečenje oboljenja digestivnog trakta, šećerne bolesti i raka (Mizrahi et al., 1997.)

Šargarepa približno sadrži 86,5 % vode, 0,24 % masnoća, 9,58 % ugljenih hidrata, 0,93 % proteina i 2,8 % vlakana (Anonymous, 2009). Pored toga, šargarepa je dobar izvor minerala i to pre svega kalijuma, magnezijuma, fosfora i kalcijuma. Od vitamina sadrži značajne količine vitamina A, C, B<sub>3</sub> i B<sub>9</sub>. 80 g kuvane šargarepe sadrži više od dva puta veću količinu od preporučene dnevne doze (RDA) vitamina A za odrasle osobe (Anonymous, 2014).

Nutritivne karakteristike šargarepe ogledaju se u bogatstvu vode, visokom sadržaju ugljenih hidrata i biljnih vlakana. Šargarepa se može koristiti u ishrani u cilju uklanjanja toksina iz organizma jer je veoma bogata kalijumom. Zbog visokog sadržaja fosfora omogućava normalno funkcionisanje mozga a zbog prisustva kalcijuma omogućava formiranje snažnih kostiju i zuba. Visok sadržaj vitamina B, naročito vitamina B<sub>3</sub> i B<sub>9</sub> omogućava pravilan razvoj organizma i normalno funkcionisanje odbrambenog sistema u cilju zaštite od bolesti. Veće količine vitamina A i C obezbeđuju zdravu kožu, brzo zarastanje rana, izbacivanje toksina iz organizma i sprečavanje starenja.

Prema nekim autorima šargarepa i njeni ekstrakti mogu biti efikasni protiv različitih mikroorganizama kao što su bakterije i gljive (Ahmed et al., 2005; Abdulaali, 2009). Nekoliko autora ističe da antimikrobna aktivnost šargarepe potiče od prisustva etarskih ulja. Prema podacima Beniabdellah et al., (2012), etarska ulja šargarepe imaju sposobnost da inhibiraju rast *Candida albicans*, *Bacillus cereus* i *L. monocytogenes*, dok Misiaka et al., (2004), nalaze da etarska ulja šargarepe mogu biti korisna u sprečavanju rasta *Alternaria*

*alternata*. Noriega et al. (2010) su takođe proučavali antimikrobnu aktivnost šargarepe na *L. monocytogenes* na različitim temperaturama. Prema ovim autorima antilisterijska aktivnost šargarepe zavisi od stanja kulture i pripreme šargarepe. Odumiranje *L. monocytogenes* je uočeno u mnogo kraćem roku u soku šargarepe nego u kolutićima šargarepe. Nguyen i Lund (1991), takođe ukazuju da šargarepa pokazuje letalni efekat na različite predstavnike iz roda *Listeria*.

**Kupus** (*Brassica oleracea var. capitata*) je višegodišnja zeljasta biljka koja u toku prve godine obrazuje glavicu, koju čini skraćeno stablo sa koga polazi veći broj krupnih mesnatih listova. Ovo povrće se odlikuje visokom biološkom i malom kalorijskom vrednošću.

Kupus u proseku sadrži: 90,3 % vode, 5,8 % ugljenih hidrata, 1,3 % proteina, 0,1 % masti i 2,5 % dijetalnih vlakana. Od vitamina, najzastupljeniji je vitamin C i beta karoten kao i minerali: kalijum, kalcijum, gvožđe, magnezijum, fosfor i cink (Anonymous, 2009). Male količine natrijuma i povoljan odnos kalcijuma i fosfora osiguravaju maksimalno iskorišćenje kalcijuma u organizmu.

U ishrani, kupus se može koristiti svež, kuvan ili ukišelnjen. U svežem stanju najčešće se konzumira u obliku jednostavnih ili mešanih salata. Jedna od najčešće pripremanih salata je kupus salata (coleslaw) koja se priprema kao mešavina kupusa i šargarepe u odnosu 80:20 (Francis i O'Beirne, 2002) uz dodatak majoneza, senfa, sirćeta, soli i šećera.



**Slika 2. Kupus (*Brassica oleracea var. capitata*)**

Treba istaći da sok od svežeg kupusa može biti koristan u lečenju različitih oboljenja kao što su čir na želucu i dvanaestopalačnom crevu (Oguwike et al., 2014).

Detaljna klinička istraživanja dala su dokaze da se svežim sirovim sokom belog kupusa te bolesti mogu izlečiti bez operacije. Sprovođenje tog prirodnog lečenja je jednostavno; Uz dijetalnu hranu (bez pečenog, prženog, bez svinjskog mesa i masti, sirćeta, s veoma malo soli, bez začina, alkohola, bez pušenja i dr.) daje se bolesniku, prema stanju bolesti, dnevno do jednog litra svežeg iscedenog soka, koji se tokom dana pije u gutljajima. Posle 3 do 4 nedelje tačno pridržavane terapije u pravilu će biti izlečen čir na dvanaestopalačnom crevu i čir na želucu.

Takođe se redovnim konzumiranjem kupusa u organizam unose bitni sastojci koji mogu obezbediti odbranu organizma od raznih bolesti. Zbog bogatstva celulozom i biljnim vlaknima, kupus poboljšava probavu, deluje povoljno na zaceljivanje rana. Redovna upotreba kupusa u ishrani može poslužiti kao preventiva u smanjenju pojave raka. Prema podacima Larsson et al. (2006) jedna ili više porcija kupusa nedeljno, smanjuje rizik od raka prostate. Feskanich et al. (2000) preporučuju konzumiranje 5 ili više porcija povrća (kupusa, brokolija, karfiola, rotkve) kao prevenciju nastanka raka pluća.

Sastojci koji imaju antikancerogenu aktivnost a koji potiču iz kupusa su flavonoidi i druge fenolne komponente, indol i sulforafan (Murillo i Mehta, 2001). Indol i izotiocianati mogu kod miševa i pacova da inhibiraju razviće raka bešike, pluća, debelog creva, jetre i želuca (Hecht, 2000; Murillo i Mehta, 2001; Yang et al., 2010). Osim toga, kupus sprečava skorbut, leči hronični zatvor, jača odbrambeni mehanizam organizma, leči malokrvnost, plućne bolesti, proširene vene, smanjuje holesterol i deluje antiseptično. Posebno su delotvorne obloge od zagrejanih listova kupusa protiv glavobolje, išijasa, čireva, upala, opekotina, reume, uboda insekata, astme i bronhitisa (Pamplona–Roger, 1999).

## **2.2. Povrće kao izvor mikroorganizama**

Bilo koje povrće da se upotrebljava za ishranu u vidu salata mora biti sveže, zdravo i dobro oprano. Ranija istraživanja su dokazala da povrće koje se koristi u ishrani može biti kontaminirano mikroorganizmima kada se navodnjava otpadnim vodama ili kada se za đubrenje zemljišta koristi stajnjak (Rosas et al., 1984). Zbog toga, samo povrće kao sirovina za pripremu salata može biti nosilac većeg broja patogenih mikroorganizama koji kod ljudi mogu izazvati različite zdravstvene probleme.

Otpadne vode koje sadrže i kanalizacione vode veoma često se koriste za navodnjavanje povrtarskih kultura, naročito u zemljama koje imaju ograničene vodne resurse. Prema podacima Crous (2011), kontaminirana voda ukoliko se koristi za navodnjavanje useva, može biti povezana sa prisustvom velikog broja patogenih mikroorganizama na površini plodova povrća.

Ispitivanjem kontaminacije različitih povrtarskih kultura patogenim bakterijama iz vode za navodnjavanje, Kljujev (2012), nalazi da bakterijski sojevi *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071, *E. coli* PBA28, *Herbaspirillum frisingense* GSF30BA28, *Salmonella typhimurium* LT2, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella typhimurium* S1, *Listeria monocytogenes* EGD-E, *Listeria monocytogenes* SV4B, *Ochrobactrum anthropi* 1ADSM14396, *Roseomonas genomospecies* 6CCUG33010, površinski i endofitno kolonizuju koren, stablo i list ispitivanih biljnih vrsta. Pri tom je utvrđeno da *L. monocytogenes* EGD-E površinski i endofitno može kolonizovati koren šargarepe, peršuna i celera. Od ostalih biljnih vrsta, značajan broj *L. monocytogenes* EGD-E je detektovan u površinskom sloju i unutrašnjosti korena kukuruza šećerca, kao i na površini korena zelene salate i spanaća. Kolonizacija korena sa *L. monocytogenes* SV4B bila je najizraženija kod zelene salate i spanaća.

Prema istraživanjima Crous (2011), samo pranje povrća čistom vodom može da smanji prisutan broj *L. innocua* na površini brokolija, dok ukoliko se za pranje koristi hlorisana voda sa 200 ppm hlora, moguće je postići smanjenje površinske kontaminacije veće od 1log ciklusa. Isti autor ističe da pranje povrća hlorisanom vodom i pakovanje u modifikovaoj atmosferi (5% CO<sub>2</sub> i 5% O<sub>2</sub>) na temperaturi od 4°C može smanjiti prisutan broj *L. monocytogenes*, ali je za njeno potpuno uništavanje neophodno primeniti neki strožiji tretman (zagrevanje mikrotalasima, visoke temperature itd). Pošto se salate konzumiraju u svežem stanju, to je svakako neprihvatljiv način za smanjenje početne kontaminacije povrća i postizanje odgovarajućeg stepena bezbednosti potrošača.

Efikasnost metode koja se koristi za pranje i dekontaminaciju svežeg povrća koje je kontaminirano bakterijom *L. monocytogenes* je od presudnog značaja za zdravstvenu bezbednost potrošača jer je ovaj mikroorganizam sposoban da se adaptira na stres koji nastaje kao posledica delovanja povećane kiselosti, toplote ili osmotskog pritiska. Iz tih



razloga, Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO) preporučuje da voda koja se koristi za pranje povrća mora imati višu temperaturu, kako bi se sprečio prodor patogenih mikroorganizama kod povrća (Dogbe, 2010). Tako na primer, ako se topli plodovi urone u hladnu vodu, nastaje razlika pritiska između unutrašnjosti ploda i okolne vode, što omogućava patogenim mikroorganizmima da prodru u unutrašnjost ploda i to najčešće u delu oko peteljke (Bartz i Showalter, 1981; Rushing et al., 1996). Ukoliko dekontaminacija povrća nije uspešno izvedena, *L. monocytogenes* može da preživi i raste na povrću na niskim temperaturama, dostižući nivo koji može da izazove pojavu listerioze kod ljudi, kada se takvo povrće konzumira u svežem obliku.

Prema literaturnim podacima može se videti da je *L. monocytogenes* čest uzročnik zagađenja povrća a samim tim i svežih salata ali je obično prisutna u malom broju (< 100 CFU/g). Podaci o ponašanju ovog patogena u salatama i povrću ukazuju da pod normalnim uslovima skladištenja (4°C za 7 dana) najčešće dolazi do porasta početnog broja mikroorganizama za 1-2 log ciklusa (Lake et al., 2005). Povrće koje može poslužiti kao dobra osnova za rast *L. monocytogenes* su: kupus, paradajz, cikorija, zelena salata, asparagus, brokoli, karfiol i celer (Beuchat et al., 1986; Beuchat i Brackett, 1990; Beuchat i Brackett, 1991; Aytac i Gorris, 1994). Sa druge strane, podaci o povrću koje može inhibirati rast ovog patogena su malobrojni. Među njima najznačajniji su rendana šargarepa i mladice pasulja (Aytac i Gorris, 1994; Jacxsens et al., 1999).

Među mikroorganizmima koji se najčešće mogu preneti sa svežih plodova povrća i voća do ljudi pored *L. monocytogenes*, treba spomenuti i bakterijske vrste *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella sp.* (Beuchat, 1998). Takođe, enteropatogene bakterije su nađene na različitim plodovima povrća kao što su zelena salata, paradajz i dinje (Nutt et al., 2003). Prema podacima Fröder et al. (2007), kao i Sher et al. (2010 a) minimalno prerađeno povrće ima veoma loš mikrobiološki kvalitet i može biti prenosnik patogena kao što su *L. monocytogenes* i *Salmonella sp.* Ispitivanjem prisustva mikroorganizama u minimalno prerađenoj zelenoj salati i paprici Biniam i Mogessie (2010), ističu da je više od 97% uzoraka zelene salate i 58% uzoraka paprike imalo više od 5 log CFU/g enteropatogenih bakterija. *Salmonella sp.* je izolovana iz 10% uzoraka a *Shigella sp.* iz 30% uzoraka povrća.

Zabrinjavajuće je da sve izolovane *Salmonella* vrste i 97% *Shigella* vrsta iz povrća pokazuju rezistenciju prema penicilinu.

Nekoliko epidemija kod ljudi je bilo povezano sa konzumiranjem svežih plodova povrća. Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti, jedna od većih epidemija koja je izazvana bakterijom *L. monocytogenes* u toku 2011.godine u USA koja je imala 34 smrtna slučaja povezana je sa konzumiranjem svežih dinja (CDC). Prema podacima Deza et al. (2003) jedna od većih epidemija salmoneloze bila je pripisana kontaminiranom paradajzu.

Ispitivanje mišljenja potrošača o mogućnostima nastanka različitih oboljenja usled konzumiranja svežeg povrća i voća, otkriva da je čak 80,3 % ispitanika svesno i upoznato sa rizicima po zdravlje koji mogu poticati od patogenih mikroorganizama (Dogbe, 2010). Međutim, mali broj potrošača i to samo 2,3 % je bilo upoznato sa rizikom od konzumiranja salata kontaminiranih bakterijom *L. monocytogenes*. Ovi rezultati su u skladu sa onima dobijenim ispitivanjem potrošača u US gde je 32% ispitanika bilo svesno i upoznato sa opasnostima koje nosi sa sobom hrana kontaminirana bakterijom *L. monocytogenes* (Lin et al., 2005).

U mnogim zemljama je jasno pokazano prisustvo *L. monocytogenes* na različitim vrstama sirovog i minimalno prerađenog povrća (Beuchat, 1996). Iz tih razloga, prepoznavanje svežeg povrća kao prenosnika i izazivača oboljenja kod ljudi nije novijeg datuma. Međutim, podaci o epidemijama koje su izazvane konzumiranjem kontaminiranog svežeg povrća i voća, naročito u razvijenim zemljama su jako retki. Na primer, u toku 1996. godine, samo šest od 200 registrovanih epidemija u Ujedinjenom Kraljevstvu je bilo povezano sa konzumiranjem voća i povrća (PHLS, 1996).

Poslednjih godina, učestalost epidemija izazvanih konzumiranjem svežeg voća i povrća beleži porast zahvaljujući promenjenim navikama u ishrani stanovništva ali i povećanom uvozu hrane. Iako su promene u načinu života dovele do povećane potrošnje povrća i voća, prema rezultatima Dogbe (2010), većina potrošača konzumira povrće kod kuće. Ovo se može pripisati činjenici da potrošači zbog brojnih epidemija, smatraju da je povrće pripremljeno kod kuće sigurnije od onog pripremljenog u restoranima.

### **2.2.1. Sveže sečeno, minimalno prerađeno voće i povrće**

Sveže povrće u obliku salata je na našoj trpezi dostupno od proleća do kasne jeseni. Potrošnja svežeg povrća je povezana sa nekoliko različitih faktora kao što su pol, starost, obrazovanje, uslovi života i način života. Muškarci generalno troše manje povrća od žena (Prattala et al., 2007) dok viši stepen obrazovanja utiče na veću potrošnju povrća. Potrošači sa nižim socioekonomskim statusom konzumiraju manje količine i manje raznovrsno povrće. Razlog ovome može biti taj što potrošači iz nižih socioekonomskih grupa imaju ograničen budžet.

Zahvaljujući savremenim tehnologijama, sveže povrće se može koristiti i zimi jer su povećani zahtevi potrošača za svežim povrćem kao pogodnom hranom koja može obezbediti organizmu odgovarajuće hranljive i zaštitne sastojke doveli do razvoja sektora koji se bavi proizvodnjom sečenog, minimalno prerađenog povrća. Najveća proizvodnja i potrošnja ove vrste prehrambenih proizvoda je skoncentrisana u Severnoj Americi sa SAD-om kao liderom.

Sveže sečeni proizvodi od voća i povrća prvi put su se pojavili na tržištu Amerike, četrdesetih godina prošlog veka. Najveća potrošnja ove kategorije hrane bila je vezana za restorane brze hrane. U Evropi, sveže sečeno povrće pojavilo se osamdesetih godina prošlog veka i to prvo na tržištu Francuske, a kasnije se proširilo i na druge evropske zemlje kao što su Švajcarska, Italija, Španija, Velika Britanija i dr. (Martin-Belloso i Soliva-Fortuny, 2011).

Prema King i Boling (1989), sveže sečeni proizvodi se definišu kao bilo koje sveže povrće ili voće, ili njihova kombinacija, koji su fizički različiti od svog originalnog oblika, ali nisu podvrgnuti procesu prerade primenom toplote ili hemijskih sredstava i ostaju u svežem stanju. Sveže sečeni proizvodi podrazumevaju oprano, oljušteno i isečeno voće i povrće (Lindsay et al., 1999). Sveže sečeno povrće predstavlja svež proizvod koji je minimalno prerađen i odmah spreman za upotrebu.

Većina potrošača daje prednost sveže sečenim i minimalno prerađenim plodovima voća i povrća u poređenju sa konzervisanim ili smrznutim plodovima, ali tek posle celih, svežih i neprerađenih plodova voća i povrća (Sonti, 2000). Sveže sečeni i minimalno prerađeni plodovi voća i povrća dobili su veću popularnost na tržištu poslednjih nekoliko

godina zbog sve užurbanijeg životnog stila koji je naročito prisutan u većim gradovima. Inače glavni potrošači sveže sečenih proizvoda do tada bili su restorani i industrija brze hrane (Watada et al., 1996).

Ispitivanjem mišljenja potrošača o sveže sečenim proizvodima od voća i povrća Sonti (2000), ističe da 30% anketiranih potrošača daje prednost sveže sečenim proizvodima u odnosu na cele, neprerađene plodove voća i povrća pre svega zbog kraćeg vremena pripreme i pogodnih porcija za serviranje. Ispitivanjem potrošača starosti od 18 do 55 godina, prema podacima Sonti (2000), većina ispitanika koristi sveže sečene proizvode bar jedan put nedeljno. Učestalost upotrebe sveže sečenog voća i povrća je veća kod ispitanika starosti 18 do 45 godina međutim, može se uočiti smanjenje učestalosti upotrebe ovih proizvoda kod ispitanika starijih od 46 godina. Takođe, ženski pol više voli da koristi ove proizvode od muškaraca. Anketirani najčešće koriste sveže sečene jabuke, jagode i ananas a od povrća kupus, brokoli, karfiol, celer, krastavac, zelenu salatu, spanać, paradajz, dinje i lubenice.

Minimalno prerađeni, sveže sečeni proizvodi daju veoma pogodan proizvod koji je odmah spreman za upotrebu ali je njegov rok trajanja bitno ograničen. Zbog toga je održavanje kvaliteta ovih proizvoda jedan od izazova sa kojim se suočava sektor koji se bavi proizvodnjom minimalno prerađene hrane.

Sveže sečeni proizvodi su lako kvarljivi iz jednostavnog razloga što im je uklonjena pokožica (koja je služila kao prirodni zaštitni sloj) sa njihove površine i jer su prilikom ljuštenja, usitnjavanja i rezanja bili izloženi fizičkom stresu. Oštećenje tkiva izaziva povećanu respiraciju i proizvodnju etilena, kao i povećan gubitak u težini (Watada et al., 1996). Takođe, razaranje ćelijskog zida dovodi do neželjenih enzimatskih reakcija, isticanja ćelijskih sastojaka, gubitka vlažnosti i konačno rezultuje kraćim rokom trajanja (Baldwin et al., 1996; Jiang i Joyce, 2002). Ukoliko nisu pod kontrolom, ove promene dovode do starenja i propadanja proizvoda. Zato sveže sečene proizvode treba čuvati na temperaturama koje su niže od onih koje se preporučuju za celo, neprerađeno voće i povrće (Watada et al., 1996).

Na tržištu razvijenih zemalja najčešće se od voća može naći lubenica, dinja, ananas, jagoda, grejpfrut, jabuka, kruška, breskva i nektarina a od povrća zelena salata, kupus,

šargarepa, crni luk, pečurke, brokoli, krompir, paradajz i bundeva (Martin-Belloso i Soliva-Fortuny, 2011). Na domaćem tržištu ovi proizvodi se mogu naći u bolje snabdevenim trgovinskim centrima i pretežno obuhvataju usitnjene plodove povrća koji su namenjeni za pripremu salata. Među njima najzastupljeniji su sečeni kupus, šargarepa kao i njihove mešavine, uz dodatak praziluka, radiča, zelene salate, brokolija i karfiola.

Promene kvaliteta koje se javljaju kod sveže sečenog, minimalno prerađenog povrća mogu biti različite i zavise od stepena zrelosti, vrste, temperature, koncentracije kiseonika i ugljendioksida kao i od pritiska vodene pare. Kod sveže sečenog kupusa najčešće dolazi do potamnjenja i porasta broja mikroorganizama (Watada i Qi, 1999). Kod zelene salate dolazi do pojave potamnjenja, rasta mikroorganizama (Watada i Qi, 1999) i visoke stope respiracije usled čega salata veoma brzo gubi svežinu (Watada et al., 1996). Paradajz sečen na kriške brzo propada i dobija oštećenja od niskih temperatura (Hong i Gross, 2001) dok kod sečenih dinja dolazi do pojave providnosti tkiva, povećane stope respiracije i truljenja pod dejstvom gljiva (Bai et al., 2001). Najbrojnije su promene kvaliteta kod sečene šargarepe i one obuhvataju formiranje beličastog, suvog sloja na površini oguljene šargarepe, smanjenje kvaliteta korena, gubitak ukusa usled povećane respiracije, formiranje gorkog ukusa, i gubitak karotena (Ghaouth et al., 1991; Krochta et al., 1993; Avena-Bustillos et al., 1994; Howard i Dewi, 1995; Chen et al., 1996; Cheah et al., 1997; Li i Barth, 1998).

Mnogi potrošači su sumnjičavi prema upotrebljenim hemijskim sredstvima u prehrambenim proizvodima, naročito ukoliko je reč o minimalno prerađenim, sveže sečenim plodovima voća i povrća. Hemijski konzervansi koji mogu veoma uspešno inhibirati enzimske reakcije potamnjenja i ujedno ispoljavaju i antimikrobno dejstvo su sulfiti, ali je njihova upotreba zabranjena zbog negativne reakcije potrošača (Kim et al., 1993; Baldwin et al., 1996). Prema nekim autorima, hemijski konzervansi utiču na ukus i miris sveže sečenog voća (Rocha et al., 1998). Za sprečavanje propadanja minimalno prerađenih proizvoda i očuvanje njihovog kvaliteta mogu se koristiti različite tehnike. One pre svega obuhvataju rashlađivanje, pakovanje u modifikovanoj atmosferi, pakovanje u kontrolisanoj atmosferi i primenu jestivih omotača.

Najzastupljenija metoda u obezbeđivanju kvaliteta i kontrolisanju propadanja sveže sečenog, minimalno prerađenog voća i povrća je rashlađivanje na niskim temperaturama sa visokom relativnom vlažnošću. Međutim, ova metoda može izazvati oštećenje plodova niskim temperaturama. Pošto je veoma teško precizno kontrolisanje temperature u toku skladištenja, potrebni su drugi načini čuvanja plodova voća i povrća. Pakovanje u modifikovanoj atmosferi korišćeno je da bi se produžio rok trajanja celih plodova nakon berbe, smanjenjem stope respiracije i odlaganjem propadanja. Međutim, ovaj postupak može izazvati anaerobiozu i plodovi ne uspevaju pravilno da sazre (El Ghaouth et al., 1992). Istraživači su sprovedi opsežna istraživanja u cilju određivanja optimalnih uslova atmosfere za skladištenje celih svežih plodova, ali postoje ograničeni podaci o optimalnom sastavu atmosfere za sveže sečene proizvode (Gunes et al., 2001).

### **2.3. Jestiva ambalaža**

Jestiva ambalaža se počela koristiti tridesetih godina XX veka, pre svega za pakovanje citrus voća radi zaštite od isušivanja. Tokom pedesetih godina počeo se koristiti i karnauba vosak za pakovanje svežeg voća i povrća. Jestiva ambalaža se može primenjivati u obliku jestivih filmova i omotača. Omotači se formiraju na samoj hrani, tako što se tečni rastvori ili disperzije, upotrebom odgovarajućih metoda (raspršivanje, premazivanje i slično) nanose direktno na površinu hrane i na njoj polimerizuju, stvarajući prijanjajući omotač. Filmovi se formiraju odvojeno od hrane, najčešće u vidu folija, a sa hranom dolaze u kontakt kao već formirani polimeri.

Polimeri koji se mogu koristiti za izradu filmova, prema poreklu i načinu proizvodnje se, mogu podeliti na (Popović, 2013):

1. polimere ekstrahovane / izolovane direktno iz biomase,
2. polimere proizvedene klasičnim hemijskim sintezama od biomonomera i
3. polimere dobijene direktno iz prirodnih ili genetički modifikovanih organizama.

**Polimeri ekstrahovani / izolovani direktno iz biomase** su najviše eksploatisani. Ovi polimeri se dobijaju od biljaka, morskih i domaćih životinja. Primeri su polisaharidi: celuloza, skrob i hitin; i proteini: kazein i gluten. Ovi materijali imaju dobra barijerna svojstva za gasove, ali su veoma hidrofilni (Popović, 2013).

**Polimeri proizvedeni klasičnim hemijskim sintezama** su takođe mnogobrojni, jer hemijske sinteze omogućavaju dobijanje većeg broja biopoliestara. Teorijski je moguće sve dosadašnje polimerne materijale zameniti novim vrstama dobijenim od obnovljivih monomera, ali je to pre svega pitanje ekonomske opravdanosti. Najpoznatiji biopolimer iz ove grupe je polimlečna kiselina (Popović, 2013). Polimlečna kiselina se može formirati u vidu folija, termoformiranih posuda ili raspršivanjem ukomponovati u kombinovane materijale.

**Polimeri dobijeni direktno iz prirodnih ili genetički modifikovanih organizama** obuhvataju polihidroksialkonoate i bakterijsku celulozu. Ovi polimeri se akumuliraju u mnogim bakterijama kao izvori energije i rezerve ugljenika. Njihove osobine najviše zavise od osobina monomera od kojih su izgrađeni što omogućava široku lepezu različitih biopolimera koji se mogu sintetisati pomoću mikrobioloških fermentacija. Najčešće je u upotrebi derivat polihidroksibutirat (Popović, 2013).

U cilju primene za dobijanje jestivih filmova, čija je aplikacija moguća za pakovanje prehrambenih proizvoda, u proizvodnji omotača i kapsula u farmaceutskoj industriji itd., najviše proučavani biopolimeri su oni ekstrahovani direktno iz biomase. Filmovi, koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, proizvode se od jestivih polimera i prehrambenih aditiva, pa se mogu okarakterisati kao jestivi i biorazgradivi polimeri. Pod biorazgradljivošću filmova podrazumeva se da se oni potpuno degradiraju u prisustvu mikroorganizama, u procesu kompostiranja, do ugljen-dioksida, vode, metana, i jednog dela ostatka u vidu biomase (Anonymous, 1993).

Jestivi filmovi imaju niz sličnih osobina kao i sintetički polimeri koji se koriste za pakovanje hrane. Međutim, njihova prednost u odnosu na sintetičke materijale ogleda se pre svega u tome što se jestivi filmovi mogu konzumirati zajedno sa hranom, čime se značajno smanjuje pojava otpada i problem zagađenja životne sredine i što se mogu proizvoditi iz obnovljivih izvora.

Kada se za proizvodnju filmova koriste proteini za humanu ishranu i prehrambeni aditivi (npr. plastifikatori, kiseline ili baze, soli i enzimi), a usled termičkog tretmana, pH modifikacije, dodatka soli, enzimske modifikacije itd., dolazi samo do promene proteina i gubitka vode, dobijeni filmovi spadaju u grupu jestivih (Krochta i De Mulder-Johnston,

1997). Međutim, jestivost se gubi kada protein reaguje sa nejestivim hemikalijama, pre ili za vreme formiranja filma (npr. hemijsko ugrađivanje različitih molekula), ili kada se dodaju nejestive komponente u film. Najčešće, ovi filmovi imaju ulogu ambalažnog materijala, i pružaju brojne prednosti u cilju očuvanja kvaliteta sveže sečenih proizvoda, ali samo u slučaju da se takvi proizvodi čuvaju na odgovarajućoj temperaturi, što zavisi od vrste proizvoda. Jestivi filmovi mogu delovati kao barijera za razmenu gasova ( $O_2$  i  $CO_2$ ), predstavljaju dobru barijeru prema vodenoj pari sprečavajući upijanje ili otpuštanje vlage, kontrolišu rast mikroorganizama, čuvaju boju, teksturu i vlažnost proizvoda i na taj način mogu značajno produžiti rok trajanja sveže sečenih proizvoda.

Pored barijernih osobina prema gasovima, jestivi filmovi moraju imati i odgovarajuće mehaničke osobine koje su značajne za njihovu primenu kao ambalažnog materijala.

Debljina filмова je važna karakteristika koja direktno utiče na ostale osobine filma (mehaničke, barijerne, biološke), na potencijalnu primenu filma i održivost upakovanog proizvoda. Efikasnost filma u cilju zaštite upakovanog proizvoda pre svega zavisi od kontrole rasipanja upakovanog proizvoda, što je direktna posledica debljine filma (Skurtys et al., 2010). Debljina filma ne sme prelaziti minimalnu i maksimalnu kritičnu vrednost, kako film ne bi drastično redukovao unutrašnju koncentraciju kiseonika ili povećao koncentraciju  $CO_2$ , kod anaerobne fermentacije upakovanog proizvoda.

Osim toga i mehaničke osobine filмова kao što su zatezna jačina, izduženje pri kidanju idr. mogu biti veoma važne pri karakterisanju i odabiru filмова (Nielsen i Landel, 1994).

Pored mehaničkih i barijernih svojstava prema gasovima, aromama i vodenoj pari, jestivi filmovi moraju predstavljati dobru barijeru za mikroorganizme kako bi se mogli uspešno koristiti za čuvanje hrane (Krochta i De Mulder-Johnston 1997; Cha i Chinnan 2004). Jestivi filmovi, u kombinaciji sa antimikrobnim agensima predstavljaju važan faktor u kontroli rasta mikroorganizama na površini upakovanog proizvoda, obezbeđujući time duži rok trajanja i poboljšavajući mikrobiološku sigurnost proizvoda (Padgett et al., 1998; Kourwel et al., 2011).

Iz tih razloga se u jestive filmove mogu inkorporirati različiti antimikrobni agensi ali je jedan od bitnih uslova da oni budu neškodljivi za ljudsko zdravlje. Na prvom mestu,



kao antimikrobni agensi mogu se primenjivati različite organske kiseline i njihove soli (benzoeva kiselina, natrijum benzoat, sorbinska kiselina, kalijum sorbat, propionska, mlečna i sirćetna kiselina itd.) (Cuppett, 1994; Han, 2000). Prirodni antimikrobni agensi mogu biti enzimi (Min et al., 2005; Gúcbilmez et al., 2007), protein, peptidi i masne kiseline (Hoffman et al., 2001), pigmenti, arome, etarska ulja i začini (Oussalah et al., 2004; Rojas-Grau et al., 2006). Od prirodnih antimikrobnih agenasa se očekuje da imaju veliki potencijal za primenu kao antimikrobni aditivi u jestivim filmovima bez negativnih efekata, koji prate hemijske konzervanse. Ipak, neophodno je detaljnije proučiti inhibicioni nivo, antimikrobni spektar i njihovu toksičnost, u cilju obezbeđivanja maksimalne efikasnosti antimikrobnog filma.

Ispitivanjem mišljenja 611. potrošača o jestivim filmovima, utvrđeno je da više od 93,5% odnosno 74,9 % ispitanika je od ranije konzumiralo plodove jabuka odnosno krastavaca, koji su bili zaštićeni nekim jestivim filmom (Sonti, 2000). Međutim, samo 54,6 % anketiranih je od ranije imalo neka saznanja o jestivim filmovima. Mali broj anketiranih je imao osnovna znanja o jestivim filmovima, dok je većina anketiranih znala samo to da oni mogu obezbediti sjajan izgled površine plodova (jestivi vosak) ili mogu sprečiti dehidrataciju plodova. Manji broj anketiranih smatra da bi pre konzumiranja trebalo ukloniti jestive filmove sa plodova. Takođe, nekolicina anketiranih smatra da ne bi koristila voće i povrće koje je tretirano zaštitnim filmovima, ukoliko bi oni poticali od nekih animalnih izvora. Oko 79,3 % anketiranih smatra da bi kupovalo sveže sečeno voće i povrće koje je zaštićeno jestivim filmovima, ukoliko bi FDA prihvatila i odobrila ove filmove.

Jestivi filmovi koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, proizvode se od jestivih polimera i prehrambenih aditiva, pa pored biorazgradljivosti imaju i osobinu jestivih polimera. Za izradu jestivih filmova, mogu se koristiti različiti materijali kao što su lipidi (ulja i voskovi), proteini (kolagen i želatin, pšenični gluten, kukuruzni zein, proteini soje, kikirikija i mleka), ugljeni hidrati – polisaharidi (celuloza, pektin, hitozan, škrob) itd.

**Lipidi** se duži niz godina koriste kao zaštitni omotači, iako nemaju sposobnost da grade koherentne samostalne filmove. Mogu da poboljšaju sjaj površine polimera i barijerna svojstva prema vodi. Voskovi, kao što su karnauba 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. Filmovi na bazi voskova imaju najveći stepen otpornosti prema migraciji vlage u odnosu na sve druge lipidne i nelipidne filmove. 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.

Lipidne komponente koje se najčešće koriste za jestive omotače, prema US FDA su acetilovani monogliceridi, ricinusovo ulje, masne kiseline (kaprinska, miristinska, laurinska, oleinska, palmitinska i stearinska), mineralna ulja, ulje kikirikija, sojino ulje, ulje repice, soli masnih kiselina, masti i loj dok se od voskova mogu upotrebljavati pčelinji vosak i karnauba vosak koji su odobreni u US kao GRAS i koriste se u izradi guma za žvakanje, tvrdih bombona i jestivih omotača. Takođe i parafinski vosak nalazi primenu u izradi jestivih omotača.

**Proteini** se, prema poreklu, mogu podeliti na proteine biljnog (gluten, zein, proteini soje, graška, kukuruza) i životinjskog porekla (kazein, kolagen, želatin, keratin). Proteini obuhvataju različite polimerne materije koje omogućavaju strukturnu i biološku aktivnost biljkama i životinjama. Za razliku od polisaharida, proteini se sastoje od aminokiselina, povezanih peptidnim vezama. Međutim, zbog prisustva bočnih grupa vezanih za  $\alpha$ -ugljenikov atom, aminokiseline se međusobno povezuju, stvarajući veliki broj proteina, različite veličine, strukture i funkcije. Većina proteina se sastoji od oko 100 - 500 aminokiselinskih ostataka. Zavisno od redosleda aminokiselina i njihovog povezivanja, formiraju se fibrilarni ili globularni molekuli, različite strukture i aktivnosti. Generalno, hemijska reaktivnost proteina zavisi od aminokiselinskog sastava, broja slobodnih amino i karboksilnih grupa i broja i vrste bočnih ostataka. Najreaktivniji bočni ostaci su serinski, hidrosiprolinski, treoninski, tirozinski, glutaminski, lizinski i argininski. Viši nivoi uređenosti molekula proteina mogu biti narušeni delovanjem različitih faktora (fizički i hemijski agensi, toplota, pritisak, zračenje itd.) (Cheftel et al., 1985).

Delovanjem spoljašnjih agenasa menja se konformacija proteina, interakcija i aktivnost, što se često koristi kod produkcije biorazgradivih proteinskih filmova (Ou et al., 2005).

Najčešće se za izradu jestivih filmova u US koriste kukuruzni zein, pšenični gluten, proteini soje, proteini kikirikija i proteini semena pamuka, od kojih su svi sem poslednjeg odobreni kao GRAS. Keratin, kolagen, želatin, kazein i proteini surutke su sastojci jestivih filmova koji potiču od animalnih izvora. Zbog svoje hidrofilnosti, proteinski filmovi imaju ograničenu otpornost prema migraciji vlage. Ovi filmovi takođe imaju i veoma dobra barijerna svojstva prema kiseoniku, pri niskoj relativnoj vlažnosti. Prema literaturnim podacima može se videti da sami proteinski filmovi poseduju antioksidativno delovanje, s obzirom na prisustvo peptida sa antioksidativnim delovanjem (Giménez et al., 2009; Weng et al., 2009). Zbog smanjene propustljivosti kiseonika i prisustva peptida sa antioksidativnom aktivnošću, primenom ovih filmova se takođe može smanjiti i oksidacija proizvoda (Cuq et al., 1998).

Veliki broj proteina pobuđuje pažnju istraživača zbog svojih filmogenih osobina. Sojini proteini (Kokoszka et al., 2010), proteini surutke (Wang et al., 2008; Zhang et al., 2016), pšenični gluten (Lim et al., 2002), kukuruzni zein (Cheng et al., 2015), želatin (Wang et al., 2009), kazein, proteini kikirikija, graška, sočiva (Liu et al., 2004 a; Bamdad et al., 2006; Kowalczyk i Baraniak, 2011), uspešno se koriste za proizvodnju polimera.

**Polisaharidi** su prirodni polimeri koji se koriste u proizvodnji hrane kao emulgatori, sredstva za zgušnjavanje, želiranje i stabilizaciju. Polisaharidi i njihovi derivati imaju široku primenu u proizvodnji jestivih filmova. To su, pre svih, alginati, pektini, hitozan, karagenan, skrob, hidrolizati skroba i derivati celuloze. Zbog hidrofilne prirode ovih molekula, njihova primena je ograničena jer imaju slaba barijerna svojstva prema vodi. Ipak, u slučaju kada je neophodno održati vlažnost proizvoda, ovi filmovi predstavljaju dobar izbor.

Zbog toga što je u eksperimentalnom delu rada korišćen hitozan i želatin za pripremu jestivih filmova u ovom delu biće predstavljene opšte karakteristike ovih materijala.

### **2.3.1. Filmovi na bazi želatina**

Želatin je protein dobijen parcijalnom degradacijom kolagena i zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti i biorazgradivosti pokazuje veliki potencijal kao sirovina za proizvodnju

jestivih filmova. Razlikuju se dva tipa želatina - A i B, u zavisnosti od toga da li priprema uključuje ili ne kiseli ili alkalni predtretman, čime se konvertuju asparaginski i glutaminski ostaci u odgovarajuće kiseline, rezultujući povećanim viskozitetom (Zhao et al., 2008). Kiseli predtretman (želatin tipa A) se primenjuje uglavnom za želatin dobijen iz svinjeke kože, a alkalni predtretman (želatin tipa B) kod želatina izolovanog iz kostiju životinja.

Postupak dobijanja želatina iz kolagena obuhvata dve faze:

1. termičku denaturaciju, na 40°C, čime se raskidaju vodonične i elektrostatičke veze, i
2. hidrolitičku razgradnju kovalentnih veza (Eastoe i Leach, 1977).

Želatin se najčešće dobija u vidu ljušpica svetlo žute boje, bez ukusa i mirisa. Sadrži 8-13% vlage. Kada se potopi u hladnu vodu, brzo bubri i povećava zapreminu. Zagrevanjem se topi i daje bistre rastvore svetložute boje. Rastvorljiv je u vodenim rastvorima polihidroksilnih alkohola kao što su glicerol i propilen glikol. Organski rastvarači koji takođe mogu poslužiti za rastvaranje želatina su sirćetna kiselina i trifluoroetanol. Ne rastvara se u polarnim organskim rastvaračima kao što su benzen, aceton i primarni alkoholi (Finch i Jobling, 1977). Najznačajnija svojstva želatina su viskozitet i čvrstina gela. Viskoznost rastvora želatina pored molekulske težine zavisi i od koncentracije želatina i temperature. Viskoznost se povećava sa povećanjem koncentracije želatina i sa smanjenjem temperature. Na visokim temperaturama dolazi do njegove razgradnje.

Najznačajnija osobina želatina je sposobnost formiranja gela. Kada se vodeni rastvor želatina ohladi na temperaturu ispod 35°C, prvo se uočava povećanje viskoziteta a zatim dolazi do formiranja gela. Čvrstina ili snaga gela zavise pre svega od koncentracije želatina ali i od pH vrednosti, temperature i prisustva drugih aditiva.

Pri proizvodnji i upotrebi želatina treba imati u vidu činjenicu da želatin predstavlja odličnu podlogu za razvoj mikroorganizama. Postoje predstavnici mikroorganizama koji mogu da vrše hidrolitičku razgradnju želatina. Zbog toga prilikom proizvodnje želatina koji je namenjen za prehrambenu industriju treba voditi računa da 1g želatina sadrži manje od 3000 aerobnih bakterija, dok za želatin koji će se koristiti u farmaceutskoj industriji ukupan broj aerobnih bakterija po gramu nije veći od 1000 (GMIA, 2012).

Želatin ima odlične osobine neophodne za formiranje filmova. Pri tom, dobijeni filmovi imaju veoma dobre mehaničke karakteristike. Treba istaći da je želatin jedinstven među hidrokolidima po tome što formira termo-reverzibilne filmove, sa tačkom topljenja bliskoj telesnoj temperaturi, što je posebno značajno kod proizvodnje jestivih i filmova za farmaceutsku upotrebu (Achet i He, 1995). Istraživanja govore o velikim mogućnostima proizvodnje želatinskih jestivih filmova ali i kompozitnih filmova, kojima je jedna od komponenti želatin tipa A (Wang et al., 2009) ili želatin tipa B (Cao et al., 2009).

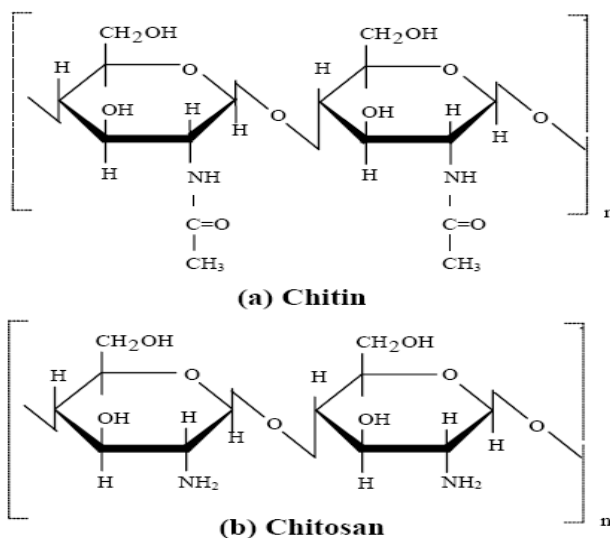
Kao omotač za kuvanu šunku i Bolonjsku kobasicu, Gill (2000) je primenio biorazgradivi film na bazi želatina koji sadrži lizozim, nizin i EDTA, u cilju kontrole rasta patogenih mikroorganizama. Antimikrobni film pokazao je baktericidno delovanje na Gram pozitivne patogene: *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. monocytogenes* i *Salmonella typhimurium* (Gill, 2000). Kompozitni film na bazi proteina uljane repice i želatina, koji sadrži ekstrakt semena grožđa pokazuje uspešno inhibirajuće delovanje na rast patogenih bakterija *E. coli* i *L. monocytogenes* (Jang et al., 2011a). Kalijum sorbat, inkorporiran u film na bazi proteina surutke, pokazao je antimikrobno delovanje na *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* i *Penicillium roqueforti* (Ozdermir, 1999). Rezultati Rodrigues i Han (2000) pokazali su da filmovi na bazi proteina surutke, koji sadrže lizozim, nisin, EDTA ili propil-*p*-benzoevu kiselinu ispoljavaju inhibitorni efekat, na rast *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Brochothrix thermosphacta*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella typhimurium*. Osim toga, filmovi na bazi proteina surutke u koje su inkorporirani različiti antimikrobni agensi ispoljavaju inhibitorni efekat na *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Y. lipolytica*, *P. roqueforti* i *P. commune* (Pintado et al., 2010).

Kristo et al. (2008) istraživali su antimikrobnu efikasnost biorazgradivih filmova na bazi natrijum kazeinata, sa nizinom, kao i natrijum ili kalijum laktatom. Rezultati ovih autora su pokazali da filmovi na bazi natrijum kazeinata ispoljavaju izraženu antimikrobnu aktivnost na rast *L. monocytogenes*.

### 2.3.2. Filmovi na bazi hitozana

**Hitozan** je najvažniji derivat hitina koji se dobija iz oklopa rakova, jastoga, školjki, nekih vrsta gljiva i insekata (Slika 3). Najvažniji komercijalni izvori hitozana su morski ljuskari i to pre svega rakovi.

Pošto jestivo meso rakova čini svega 15-20% njihove mase, ljuštura kao nejestivi ostatak, koja sadrži znatne količine hitina zaostaje kao otpadni material prilikom industrijske prerade morske hrane.



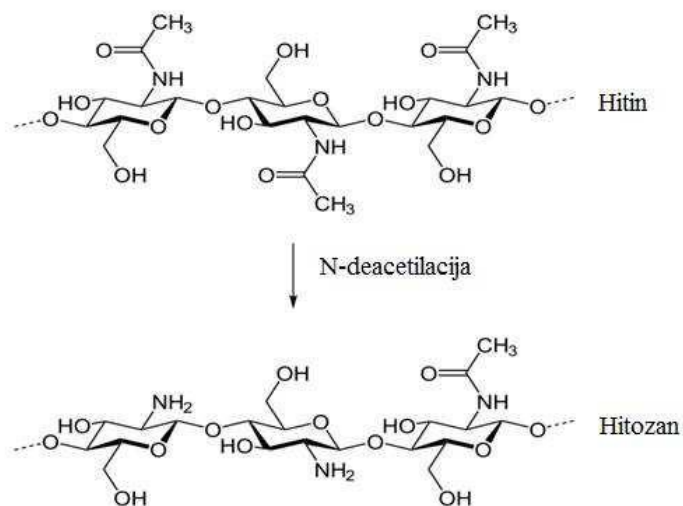
**Slika 3. Struktura (a) hitina i (b) hitozana**

Oklop rakova sastoji se u proseku od 30-40% proteina, 30-50% kalcijum karbonata, 20-30% hitina i manje količine pigmenata lipidne prirode od kojih su najzastupljeniji karotenoidi. U cilju ekstrakcije hitina iz ovog materijala, neophodno je da se prvo izvrši kiselinski tretman radi rastvaranja kalcijum karbonata, a zatim alkalna ekstrakcija radi rastvaranja proteina. Na kraju se obavezno primenjuje i depigmentacija u cilju dobijanja bezbojnog proizvoda (Acosta et al., 1993).

Hitozan se dobija iz hitina reakcijom N-deacetilacije, uz korišćenje vodenog rastvora alkalijskih, obično natrijum-hidroksida. Trajanje reakcije je ograničeno različitim faktorima: koncentracijom alkalijskih, temperaturom, veličinom čestica hitina itd. Proces deacetilovanja se najčešće vodi dok N-deacetilovani hitin ne postane rastvoran u razblaženoj sirćetnoj, mravljoj ili itakonskoj kiselini. Na taj način se u hitozan uvode

reaktivne amino grupe koje mu daju karakter katjenskog polielektrolita ( $pK_a \approx 6,5$ ), što ga izdvaja od većine ostalih prirodnih polimera koji su najčešće neutralni (Çaykara et al., 2006). Reakcija deacetilacije pomoću koje se dobija hitozan, prikazana je na Slici 4.

Hitozan ima čvrstu, kristalnu strukturu, usled obrazovanja inter- i intramolekulskih vodoničnih veza. Kod hitozana mogu, u širokim granicama, da variraju stepen deacetilovanja (40-98%) i molska masa (50.000-200.000 g/mol). Ova dva parametra znatno utiču na fizičko-hemijska svojstva hitozana, a time i na njegovu primenu (Nešić, 2012).



**Slika 4. Dobijanje hitozana**

Zahvaljujući nizu povoljnih svojstava hitozan je posebno interesantan kao biomaterijal jer je, pored prednosti koje ima kao prirodni polimer, pH osetljiv, može da formira komplekse, lako se hemijski modifikuje i ima znatnu mukoadhezivnost, afinitet ka proteinima i otpornost na hemijske proizvode i gljive (Kalagasidis Krušić, 2007).

Primarna jedinica hitozana je 2-amino-2-deoksi-D-glukoza koja je u molekulu povezana  $\beta$ -(1-4) glukozidnim vezama pa je po molekularnoj strukturi hitozan vrlo sličan strukturi celuloze. Dobro se rastvara u razblaženim rastvorima organskih kiselina, uključujući mravlju, sirćetnu, limunsku i itakonsku kiselinu (Ravi Kumar, 2000).

Hitozan pri  $pH < 6,5$  daje viskozne rastvore. Nerastvorljiv je u vodi. U protonovanom obliku poseduje veliku gustinu naelektrisanja i vrlo je efikasan u interakciji sa negativno naelektrisanim biomolekulima i površinama. Termička analiza je pokazala da

ovaj polimer ne podnosi temperature iznad 100-120°C (Bihari-Varga et al., 1975), iako je termička razgradnja posebno izražena tek na temperaturi iznad 200°C.

### **2.3.2.1. Upotreba hitozana**

Hitozan kao prirodni polisaharidni materijal pobuđuje veliku pažnju istraživača naročito zbog mogućnosti njegove primene u tekstilnoj industriji, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, medicini i tretmanu otpadnih voda.

U tekstilnoj industriji se razmatra upotreba hitozana za proizvodnju vlakana sa ciljem upotrebe u netkanim i konvencionalnim tekstilnim materijalima. Hitozan pokazuje izuzetna svojstva u odnosu na formiranje vlakana. U tom obliku se može koristiti i kao noseći materijal za pojedine aktivne materije. U preradi kože, hitozan se može koristiti kao sredstvo za intenziviranje nijanse kod primene različitih klasa anjonskih boja na koži (Jocić i Topalović, 2004). U Japanu, vlakna hitozana se uspešno koriste kao hirurški konac.

U prehrambenoj industriji hitozan nalazi širok spektar različitih primena kao što su pre svega sprečavanje mikrobiološkog kvarenja hrane, formiranje biorazgradljivih filmova, emulgator za pripremu različitih emulzija itd. Prema podacima Chatterjee et al. (2004) i Rungsardthong (2006), hitozan se može uspešno koristiti i za bistrenje voćnih sokova. Pored efikasnog bistrjenja, Abd i Niamah (2012), preporučuju dodatak hitozana soku od jabuka u cilju sprečavanja enzimatskog potamnjenja, produženog roka trajanja ovog proizvoda i sprečavanja razvoja bakterija, kvasaca i plesni. Spagna et al. (1996), su uočili da hitozan pokazuje izražen efekat prema polifenolnim jedinjenjima kao što su katehin, proantocijanidini i cimetna kiselina. Ova jedinjenja usled oksidativnih promena mogu izazvati promenu svetlo žute boje kod belih vina u tamnije, smeđe nijanse kao posledica nakupljanja njihovih oksidativnih proizvoda. Dodavanjem hitozana soku od grejpfruta u koncentraciji od 0,015 g/ml, Rwan i Wu (1996) su postigli smanjenje ukupnih kiselina za oko 52,6 %. Prema podacima Kamyabi (2011), hitozan se može uspešno koristiti za ukljanjane masti, kalcijuma i fosfora iz surutke.

Takođe, značajna je i primena hitozana u izradi jestivih filmova koji se mogu koristiti za zaštitu prehrambenih proizvoda. Jestivi filmovi pre svega su značajni za zaštitu



svežih plodova voća i povrća kao i minimalno prerađenih, sveže sečenih plodova voća i povrća. Salvador et al. (1999), su primenom filmova na bazi hitozana uspeali da produže rok trajanja avokada na 24 dana pri temperaturi od 3-10°C odnosno na 6 dana pri temperaturi od 27-29°C. Takođe, krastavci, paprika babura, kivi, jagode i paradajz se mogu čuvati duži vremenski period nakon primene filma od hitozana (Shahidi et al., 1999).

I rezultati Jafarizadeh Malmiri et al. (2011), pokazuju da se omotači na bazi hitozana i glicerola mogu koristiti za smanjenje gubitaka u težini, čvrstini, promeni boje i ukupnom sadržaju rastvorljive suve materije kod banana. Jestivi omotači na bazi hitozana mogu efikasno smanjiti potamnjivanje kod ličija (Zhang i Quantick, 1997). Takođe ovi omotači mogu smanjiti gubitke u težini i promenama u koncentraciji ukupnih fenola, flavonoida i antociana. Osim toga, omotači na bazi hitozana mogu smanjiti aktivnost polifenoloksidaza i poboljšati sposobnost skladištenja voća.

Osim toga, ima podataka da hitozan može delovati kao dijetetsko vlakno i usled toga se može koristiti kao funkcionalni sastojak hrane (Aranaz et al., 2009). Ovde treba istaći njegovu upotrebu kao dodatka ishrani koji može da vezuje masti, smanjuje količinu lipida u krvi i reguliše telesnu težinu (Sumiyoshi i Kimura, 2006; Liu et al., 2008). Zbog toga je Ministarstvo zdravlja, rada i socijalne politike u Japanu odobrilo hitozan kao funkcionalnu hranu (Han et al., 1999).

Kao aditiv za hranu, hitozan je odobren u Japanu od 1983.godine, a u Koreji od 1995.godine (Rupasinghe i Yu, 2012). Međutim, do sada nije dobio GRAS status od strane FDA iako je odobren u Kanadi (Embuscado i Huber, 2009).

Zbog bioloških osobina kao što su biorazgradljivost, biopkompatibilnost i netoksičnost, hitozan je veoma atraktivan za upotrebu u farmaciji i medicini. U farmaceutskoj industriji, hitozan se koristi kao punilo u tabletama, kao nosač za kontrolisano oslobađanje lekova, za poboljšano rastvaranje lekova ili da maskira gorak ukus kod lekova koji se uzimaju oralno (Shigemasa i Minami, 1995). Hitozan je ispitivan kao materijal koji se koristi pri tabletiranju, za proizvodnju lekova sa kontrolisanim oslobađanjem. U poređenju sa tradicionalnim pomoćnim supstancama hitozan je pokazao superiorne karakteristike i fleksibilnost pri upotrebi. Osim toga, u farmaceutskoj industriji, hitozan se koristi za proizvodnju kontrolisanih sistema i implantanata za kontrolisanu

isporuku hormona tokom dužeg vremenskog perioda (Illum, 1998). U poslednje vreme se koristi i kao nosač polarnih lekova i za isporuku vakcina.

Pored toga, hitozan ima sposobnost da reguliše fiziološke funkcije organizma, da sprečava proces starenja, povećava imunitet i pomaže u brzom oporavku ljudskog organizma posle bolesti. Kao prirodno vlakno, ima izraženu apsorpcionu sposobnost i sposobnost upijanja vlage.

Hitozan pomaže peristaltiku probavnog trakta, poboljšava probavu pa se može koristiti za prevenciju raka debelog creva. Na osnovu rezultata Hirano et al. (1990), nikakvi neželjeni simptomi nisu primećeni kod eksperimentalnih životinja kojima je hitozan davan oralno u dozama od 0,7-0,8 g/kg telesne težine/dnevno, u toku 239 dana. Kod zečeva je svarljivost hitozana iznosila 39-79%, dok je kod nosilja i brojlera svarljivost ovog polimera potpuna. Nikakvi neželjeni simptomi nisu primećeni ni kod intravenske primene hitozana niske molekulske mase u dozi od 4,5 mg/kg telesne težine/dnevno, u toku 7 do 11 dana. Onishi i Machida (1999) su ispitivali biorazgradljivost i distribuciju hitozana u telu miševa nakon intraperitonealne primene. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je hitozan veoma biorazgradljiv, lako se izlučuje iz organizma putem urina i ne akumulira se u telu. Prema podacima Pangburn et al. (1982) hitozan može biti degradiran *in vivo* pod uticajem različitih proteaza (lizozim, papain, pepsin). Biorazgradnjom hitozana oslobađaju se netoksični oligosaharidi koji mogu biti ugrađeni u toku metabolizma u glukoproteine ili se izlučuju iz organizma. Iako se hitozan delimično razlaže pod dejstvom gastrointestinalnih enzima, prilikom oralnog uzimanja on se ne absorbuje u organizmu (Aranaz et al., 2009). Ovi podaci ukazuju da hitozan može biti upotrebljen kao nosač lekova u sistemu isporuke leka za oralnu i intravensku primenu.

Mogućnosti upotrebe hitozana u medicini su mnogobrojne (Dutta et al., 2004).

#### **2.3.2.1.1. Čišćenje organizma od toksina i štetnih materija**

Razvoj nauke i tehnologije doneo je čovečanstvu mnogo prednosti i boljitaka ali takođe i dosta štete. Na prvom mestu to je šteta od delovanja teških metala pod čijim uticajem može doći do nastanka različitih oboljenja. Primer su trovanja kadmijumom, koja izazivaju bolove u kostima ili trovanja živom koja dovode do oteklina. Savremena

medicina još nije razradila metode za lečenje ovih tegoba, ali je prepoznala sposobnost hitozana da apsorbuje i odstranjuje teške metale iz organizma (Prajapati, 2008). Takođe hitozan može upijati toksične materije, mineralna đubriva i hemijske boje.

#### **2.3.2.1.2. Regulacija holesterola**

Zbog svoje sposobnosti da vezuje masnoće, hitozan je upotrebljen kao dodatak ishrani. Istraživanja *in vivo* su pokazala značajno smanjenje telesne težine ili sadržaja lipida kod ljudi i životinja (Aranaz et al., 2009). Ishrana pacova sa dodatkom visoko deacetilovanog hitozana, značajno utiče na smanjenje holesterola i LDL holesterola a povećava nivo HDL holesterola u krvi (Liu et al., 2008). Prema nekim istraživanjima, hitozan je bezbedan i efikasan za snižavanje holesterola u krvi (Bokura i Kobayashi, 2003; Shimizu, 2003; Prajapati, 2008).

Ispitivanjem žena sa simptomima hiperholesterolemije koje su uzimale hitozan u količini od 1,2g dnevno, Bokura i Kobayashi (2003), uočavaju da hitozan značajno utiče na smanjenje holesterola u odnosu na placebo. U grupi ispitanika sa 60. godina starosti, hitozan značajno smanjuje ukupni i LDL holesterol a da pri tom, nikakvi neželjeni efekti nisu uočeni.

#### **2.3.2.1.3. Regulacija krvnog pritiska**

Hitozan kao dijetetsko vlakno sa pozitivnim naelektrisanjem može da se veže sa hlorom iz kuhinjske soli koji je negativno naelektrisan i da se izluči iz organizma. Na taj način hitozan može sprečiti povećanje krvnog pritiska (Prajapati, 2008).

#### **2.3.2.1.4. Ubrzavanje zarastanja rana i opekotina**

Hitozan i njegovi derivati mogu ubrzati zarastanje rana, zaustavljaju krvarenje i ublažavaju bol, ali mogu biti veoma pogodni materijali u inženjerstvu tkiva ili se mogu koristiti kao nevirusni vektori za prenos gena (Chunmeng et al., 2006). Minami (1997) je takođe ukazao na sposobnost hitozana u ubrzanom zarastanju rana na koži i kostima kod pacova i pasa. Primena hitozana u tretiranju opekotina može se pripisati njegovim brojnim pogodnostima kao što je na prvom mestu sposobnost filma da propušta kiseonik i apsorbuje vlagu (Shigemasa i Minami, 1995). Pored toga, hitozan podleže sporij

razgradnji pod dejstvom enzima lizozima, koji je prisutan u ranama kod opekotina. Na taj način se smanjuje potreba periodičnog uklanjanja hitozana sa rana, što značajno može ubrzati oporavak ovih bolesnika.

Sposobnost hitozana da utiče na ubrzano zarastanje rana prema Ueno et al. (2001) je rezultat sposobnosti hitozana da stimuliše proizvodnju fibroblasta - najtipičnije ćelije vezivnog tkiva koja ima gradivnu ulogu u sintezi svih komponenti tkiva. Potencijalna upotreba hitozana i njegovih oligomera u zarastanju rana i lečenju hroničnih crevnih bolesti uočena je i od strane drugih autora (Minagawa et al., 2007; Deters et al., 2008).

Ispitivanje sposobnosti zavoja na bazi hitozan acetata da inaktivira bakterije *in vitro* i *in vivo* u ranama kod miševa vršeno je sa Gram-negativnim vrstama *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus mirabilis* i Gram-pozitivnom vrstom *Staphylococcus aureus* (Burkatovskaya et al., 2006). Hitozan je bio mnogo efikasniji od drugih tretmana u smanjenju mikroorganizama u skladu sa svojim baktericidnim delovanjem *in vitro*. Na osnovu podataka ovih autora može se videti da hitozan acetat brzo uništava bakterije u ranama kod miševa.

Hitozan pokazuje veoma dobre rezultate u inženjerstvu tkiva (Wanyao Xia et al., 2004) za izradu veštačke kože, hrskavica itd. Takođe, zavoji sa hitozanom pokazuju veoma dobar efekat na smanjenje krvarenja i poboljšavaju preživljavanje nakon teških oštećenja jetre kod svinja (Pusateri et al., 2003).

Veći broj naučnih radova ukazuje na mogućnost primene hitozana za ubrzavanje formiranja kostiju, sprečavanje širenja ćelija tumora, prevenciju dijabetesa i regeneraciju vezivnog tkiva desni.

Antitumorno dejstvo hitozana i zaustavljanje rasta ćelija tumora objašnjava se uglavnom stimulišućim efektom imunog sistema (Kim i Rajapakse, 2005). U eksperimentima *in vitro* i *in vivo* Jeon i Kim (2002) su otkrili da oligomeri hitozana ispoljavaju antitumorno dejstvo. Studija obavljena korišćenjem laboratorijskih miševa koji su hranjeni niskomolekularnim hitozanom je pokazala da hitozan može značajno zaustaviti metastaze kod raka pluća. Delimično deacetilovani hitin, isto kao i hitin sa karboksimetil grupama je takođe bio efikasan u sprečavanju porasta tumora (Tsukada et al., 1990).

#### **2.3.2.1.5. Prečišćavanje otpadnih voda**

Upotreba hitozana našla je primenu i u prečišćavanju otpadnih voda (No i Meyers, 2000). Hemijska kontaminacija voda različitim toksičnim produktima kao što su metali, aromatični molekuli ili boje predstavlja značajan ekološki problem. Upotreba hitozana u cilju prečišćavanja voda i uklanjanja zagađivača može biti od velikog interesa za očuvanje životne sredine. Hitozan poseduje odlične sorpcione karakteristike za uklanjanje metala i boja iz otpadnih voda zbog prisustva više funkcionalnih grupa u svojoj strukturi (amino grupe i hidroksilne grupe), i velike hemijske reaktivnosti ovih grupa (Nešić, 2012).

Hitozan je slaba baza ( $pK_a \sim 6,5$ ) pa je nerastvoran u vodi i organskim rastvaračima. Međutim, u kiselj sredini slobodne amino grupe su protonovane i polimer postaje potpuno rastvorljiv pri pH nižem od 5. U kiselim rastvorima, hitozan se ponaša kao katjonski polielektrolit, zahvaljujući protonovanju amino grupa, pa je prema tome sposoban da stupi u interakciju sa odgovarajućim anjonskim bojama. Amino grupe hitozana su sposobne da stupe u interakciju sa karboksilnim ili sulfatnim grupama iz anjonskih azo boja, dok su hidroksilne i estarske grupe hitozana zaštićene solvatomizovanom vodom, i na taj način inaktivirane za interakciju. Afinitet hitozana prema azo bojama, raste sa povećanjem broja aromatičnih prstenova u strukturi boje, a opada sa povećanjem broja sulfonskih grupa u boji. Na adsorpciju boja na hitozan, pored pH vrednosti, veliki uticaj ima i vreme kontakta boje i hitozana (Jabbar et al., 2014).

#### **2.3.2.2. Antimikrobna aktivnost hitozana**

Antimikrobna aktivnost hitozana dobro je poznata od ranije i ispitivana je protiv različitih mikroorganizama kao što su alge, kvasci, gljive i bakterije, pri čemu je hitozan korišćen u različitim oblicima (rastvori, filmovi i dr). U ranijim radovima, hitozan se smatrao baktericidnim agensom. Noviji radovi karakterišu hitozan više kao bakteriostatičan a ne baktericidan agens mada tačan mehanizam antimikrobnog delovanja nije potpuno razjašnjen i može zavisiti od većeg broja različitih faktora (Raafat et al., 2008).

Do sada je predloženo nekoliko različitih mehanizama delovanja hitozana na mikroorganizme, ali tačan mehanizam još nije poznat. Jedan od najprihvatljivijih je

interakcija između pozitivno naelektrisanog hitozana sa negativno naelektrisanim ostacima na površini ćelija gljiva i bakterija, što izaziva značajne promene na površini ćelije i menja propustljivost ćelijskog zida (Helander et al., 2001; Liu et al., 2004; Je i Kim, 2006). Ovo izaziva isticanje unutarćelijskih sastojaka, kao što su elektroliti, proteini, amino kiseline, glukoza i laktat dehidrogenaza. Kao rezultat toga, hitozan inhibira normalan metabolizam mikroorganizama i konačno dovodi do smrti ćelije. Prema rezultatima Li et al. (2008), hitozan može inhibirati rast *Aspergillus niger*. Hitozan u koncentraciji od 5,0 mg/ml podstiče isticanje proteinskih materija pri pH 4,8. Nasuprot tome, hitozan pri pH 7,6 i hitin pri pH 4,8 ne uzrokuju isticanje ovih sastojaka, što ukazuje da je antigljivična aktivnost hitozana povezana sa polikatjonskom prirodom hitozana i direktno zavisi od pH vrednosti. Isticanje nukleinskih kiselina i proteina iz *Escherichia coli* je uočeno u radu Hwang et al. (1998). Transmisiona elektronska mikroskopija je otkrila da je spoljašnjost ćelijskog zida *E. coli* bila značajno iskrivljena i spržena, a citoplazmatična membrana je bila odvojena od unutrašnjeg dela ćelijskog zida nakon tretmana sa hitozanom. Tsai i Su (1999) uočavaju isticanje glukoze i laktat dehidrogenaze iz ćelija *E. coli* pod uticajem hitozana, i sugerišu da je smrt ćelija nastala kao rezultat interakcije između hitozana i ćelija *E. coli* i promena u propustljivosti membrane. Neki autori navode da hitozan generalno ispoljava jači efekat na Gram pozitivne bakterije kao što su *L. monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaris* i dr. nego prema Gram negativnim bakterijama (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*) (Jeon et al., 2001.; No et al., 2002; Coma et al., 2003.; Dutta et al., 2009).

Drugi mehanizam delovanja hitozana na mikroorganizme podrazumeva da pozitivno naelektrisani hitozan reaguje sa ćelijskom DNK nekih gljiva i bakterija, što inhibira sintezu RNK i proteina (Hadwiger et al., 1986; Liu et al., 2001). Kod ovog mehanizma delovanja, hitozan mora biti hidrolizovan do manje molekulske težine da bi mogao da prođe kroz ćeliju mikroorganizma. Rezultati Tokura et al. (1997), objašnjavaju antimikrobnu aktivnost hitozana sa prosečnom molekulskom težinom od 2200 i 9300, koji imaju stepen deacetilovanja od 0,54 i 0,51. Uočeno je da hitozan sa molekulskom težinom od 9300 se nagomilava na ćelijskom zidu i inhibira rast *E. coli*. Međutim hitozan sa

molekulskom težinom od 2200, koji prolazi kroz ćelijski zid, ubrzava rast *E. coli*. Ovi autori smatraju da je antimikrobno dejstvo hitozana povezano sa sprečavanjem prolaska hranljivih materija kroz ćelijsku membranu pre nego sa inhibicijom transkripcije sa DNK.

Jeihanipour et al. (2007) su ispitivali antimikrobnu aktivnost hitozana izolovanog iz gljiva *Rhizopus oryzae*, u poređenju sa hitozanom koji je dobijen iz oklopa ljuskara. Ovi autori su procenjivali uticaj koncentracije hitozana na životnu aktivnost tri tipična patogeni mikroorganizma i to *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *S. aureus*. Za sve ispitivane bakterije koncentracija od 200 ppm hitozana iz gljiva je bila dovoljna da smanji broj životno sposobnih bakterija za 60%. Ni jedna živa ćelija *E. coli* i *K. pneumoniae* nije uočena kod koncentracije gljivičnog hitozana od 1000ppm, dok je za potpuno uništavanje *S. aureus* bilo potrebno upotrebiti nešto manje koncentracije gljivičnog hitozana od 800ppm. Međutim, minimalna baktericidna koncentracija hitozana od morskih ljuskara koja je mogla da smanji početni broj ispitivanih bakterija bila je veća od 200 ppm. Na osnovu rezultata ovih autora može se videti da antimikrobne osobine gljivičnog hitozana se povećavaju sa porastom upotrebljene koncentracije hitozana. Međutim, mnogo veće koncentracije gljivičnog hitozana su potrebne za efikasno smanjenje broja bakterija, u poređenju sa hitozanom od morskih ljuskara. Poređenjem minimalne baktericidne koncentracije gljivičnog hitozana i onog dobijenog iz ljuštura, Jeihanipour et al. (2007) zaključuju da je antibakterijska aktivnost hitozana iz ljuštura veća od aktivnosti gljivičnog hitozana. Pri tom je minimalna baktericidna koncentracija gljivičnog hitozana za istu bakterijsku vrstu bila najmanje dva puta veća od minimalne baktericidne koncentracije hitozana iz ljuštura. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji pokazuju da hitozan iz ljuštura ispoljava snažniji baktericidni efekat na Gram pozitivne nego na Gram negativne bakterije (Liu et al., 2004; Je i Kim, 2006; No et al., 2006).

Prema podacima Rhim et al. (2006), filmovi hitozana mogu imati antimikrobnu aktivnost protiv *S. aureus*, *E. coli* i *S. typhimurium*. Takođe neki autori ukazuju na to da kompleksi hitozana i cinka mogu imati izuzetnu antimikrobnu aktivnost (Wang et al., 2004). Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti kompleksa hitozana i Zn na 11 različitih vrsta bakterija i gljiva, pokazuju da kompleksi ispoljavaju širok spektar antimikrobnih aktivnosti, koje su 2 do 8 ili 4 do 16 puta veće od onih koje ispoljava sam hitozan ili cink-

sulfat. Ispitivani kompleksi su pokazali bolju antibakterijsku nego antifungalnu aktivnost. Prema podacima ovih autora, kompleksi hitozana i cinka su naročito aktivni protiv *E. coli* i *Corynebacterial sp.* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom od 0,000313 % (hitozan-Zn w/v).

Devlieghere et al. (2004) su ispitivanjem filmova hitozana u cilju sprečavanja propadanja minimalno prerađenog voća i povrća (jagoda i zelene salate) došli do sličnih rezultata. Prema ovim autorima, film hitozana može se koristiti kao antimikrobni agens u sprečavanju rasta mikroorganizama na površini zelene salate i jagoda, međutim upotreba filma hitozana kod zelene salate nije primenljiva jer dolazi do pojave gorkog ukusa salate. Sa druge strane, negativan uticaj hitozana na promenu ukusa kod jagoda nije primećen.

### **2.3.2.3. Faktori koji utiču na antimikrobnost hitozana**

Stepen antimikrobnog dejstva hitozana zavisi od unutrašnjih i spoljašnjih faktora kao što su molekulska težina, stepen deacetilovanja, pH, temperatura, viskozitet itd. Iz tih razloga je neophodno dobro poznavati sve faktore za efikasnu primenu hitozana kao antimikrobnog agensa.

#### **2.3.2.3.1. Molekulska masa**

Tanigawa et al. (1992) ukazuju da monomer hitozana (D-glukozamin hidrohlorid) ne pokazuje nikakvu inhibiciju rasta različitih bakterijskih vrsta, dok je hitozan bio efikasan. Rezultati ovih autora ukazuju da je antimikrobna aktivnost hitozana povezana ne samo sa njegovom katjonskom prirodom već i sa dužinom njegovog lanca. Hirano i Nago (1989), su ispitivali povezanost između stepena polimerizacije hitozana i inhibicije rasta nekoliko fitopatogenih mikroorganizama. Korišćene su tri različite molekulske mase hitozana i to: hitozan sa visokom molekulskom masom (molekulske mase 400000Da i stepenom deacetilovanja = 0,95), nisko molekularni hitozan čija molekulska masa i stepen deacetilovanja nisu precizirani i oligomer hitozana čiji je stepen deacetilovanja od 2 do 8. Najjača inhibicija rasta je uočena sa nisko molekularnim hitozanom, a najslabija je uočena kod visoko molekularnog hitozana. Dobijeni rezultati su obrazloženi poteškoćom visoko



molekularnog hitozana da difunduje u agarni gel koji je sadržao ispitivane mikroorganizme, usled njegove velike viskoznosti.

Liu et al. (2006) su ispitivali antimikrobnu aktivnost hitozana sa različitim molekulskim težinama i istim stepenom deacetilovanja protiv *E. coli*. Na osnovu njihovog rada može se zaključiti da svi ispitivani uzorci hitozana imaju antimikrobnu aktivnost pri koncentracijama većim od 200 ppm. Međutim, antimikrobna aktivnost niskomolekularnog hitozana bila je veća nego ona kod visokomolekularnih uzoraka hitozana.

Shimojoh et al. (1996) takođe ističu da je antimikrobna aktivnost usko povezana sa molekulskom masom hitozana. Veći broj oralnih bakterija je bilo tretirano sa istim koncentracijama hitozana različite molekulske mase. Hitozan sa molekulskom masom 220000 Da je bio najefikasniji, dok je hitozan sa molekulskom masom 10000 Da bio najmanje efikasan. Dobijeni rezultati sugerišu da antimikrobna aktivnost hitozana varira u zavisnosti od vrste mikroorganizma.

Yalpani et al. (1992), izveštavaju da hitozan pokazuje veću antimikrobnu aktivnost protiv *Bacillus circulans* nego hito-oligosaharidi. Iz rezultata Shimojoh et al. (1996), i Yalpani et al. (1992), može se zapaziti da odnos između molekulske težine i antimikrobne aktivnosti hitozana može biti zavisn od vrste ispitivanih mikroorganizama.

Osim toga, prema rezultatima Bof et al. (2015) molekulska težina hitozana može značajno uticati i na fizičko-hemijske osobine dobijenih filmova.

#### **2.3.2.3.2. Step en deacetilovanja**

Nekoliko studija je pokazalo da biološka aktivnost hitozana značajno zavisi pored molekulske mase i od stepena deacetilovanja. Neki autori navode da je antimikrobna aktivnost hitozana veća što je stepen acetilovanja manji (Tsai et al. 2004; Andres et al. 2007). Veći broj radova je proučavao dejstvo hitozana sa različitim stepenom acetilovanja, na rast gljiva (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*), Gram pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) ili Gram negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio parahaemolyticus*). U svim

slučajevima antimikrobna aktivnost se povećava sa smanjenjem stepena acetilovanja (Tsai et al., 2002; Andres et al., 2007; Hongpattarakere et al., 2008). Prema podacima Andres et al. (2007), stepen acetilovanja je odlučujući za rastvorljivost i obrazovanje naelektrisanja, gde se NH<sub>2</sub> i OH grupe u molekulu hitozana smatraju odlučujućim reaktivnim mestima. Zato, kako se stepen acetilovanja smanjuje, biće više slobodnih amino grupa prisutnih u hitozanu a njegov antimikrobni efekat će biti veći.

#### **2.3.2.3.3. pH vrednost**

Antimikrobna aktivnost hitozana snažno zavisi od pH vrednosti. Prema podacima Tsai i Su (1999), najveća antimikrobna aktivnost hitozana je uočena pri pH 5,0. Aktivnost opada sa povećanjem pH, tako da hitozan ima veoma slabu antimikrobnu aktivnost pri pH 9,0. Proučavanjem antimikrobne aktivnosti hitozana Aider (2010) navodi da vrednosti pH ispod 6,3 mogu značajno uticati na antibakterijsku aktivnost hitozana. Pri ovim pH vrednostima, pozitivno naelektrisane amino grupe hitozana reaguju sa negativno naelektrisanim membranama ćelija i dovode do isticanja ćelijskih sastojaka i inhibicije bakterija.

Najčešće se za rastvaranje hitozana upotrebljavaju sirćetna i mlečna kiselina.

Sirćetna kiselina je bezbojna tečnost, oštrog, kiselog ukusa koja se veoma često upotrebljava u prehrambenoj industriji u cilju korekcije ukusa. Prednost ove kiseline je što je jeftina i nosi oznaku GRAS, usled čega se može primenjivati kao odličan konzervans. Istraživanja su pokazala da sirćetna kiselina smanjuje broj *L. monocytogenes* efikasnije od bilo koje druge ispitivane kiseline (mlečne, limunske ili hlorovodonične) (Young i Foegeding, 1993; Ita i Hutkins, 1991). Takođe je primećeno da je sirćetna kiselina efikasnija od mlečne i limunske kiseline u kontroli *E. coli* 0157:H7 pri pH 4,7 na temperaturi od 30 °C.

Mlečna kiselina je slaba organska kiselina. Nastaje u biološkim sistemima redukcijom pirogroždane kiseline. Predstavnici iz rodova *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.* imaju sposobnost da proizvode veće količine ove kiseline. Mlečna kiselina nalazi primenu u prehrambenoj industriji.

#### 2.3.2.3.4. Temperatura

Ispitivanje stabilnosti i antimikrobne aktivnosti hitozana molekulske težine 2050 i 1110 kDa protiv *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* i *E. coli* vršeno je na temperaturama od 4 i 25°C u toku 15 nedelja (No et al., 2006). Rezultati ovih autora pokazuju da antibakterijska aktivnost hitozana značajno zavisi od molekulske mase hitozana, temperature i vrste ispitivanih bakterija. Hitozan na temperaturi od 25°C poseduje slabiju aktivnost u poređenju sa onom koju ispoljava na temperaturi od 4°C. Isti autori uočavaju značajno smanjenje viskoziteta 1% rastvora hitozana u sirćetnoj i mlečnoj kiselini sa povećanjem temperature i vremena skladištenja.

Osim toga, fizičke osobine filmova koji su dobijeni od termički tretiranih rastvora hitozana su veće u poređenju sa rastvorima hitozana koji nisu bili podvrgnuti termičkom tretmanu. To se može objasniti povećanim brojem naelektrisanih grupa ( $\text{NH}^{3+}$  i  $\text{OH}^{1+}$ ) na površini hitozana (Bonilla et al., 2012; Thakhiew et al., 2013). Taj veliki broj naelektrisanih grupa koji nastaje kao rezultat termičkog tretmana hitozana, promovira formiranje većeg broja interakcija unutar molekula koje dovode do povećanja zatezne čvrstoće filmova (Benavides et al., 2012). Prema rezultatima Thakhiew et al. (2015), zagrevanjem i homogenizacijom se može poboljšati zatezna jačina filmova hitozana u rasponu od 19-57%, u poređenju sa kontrolom koja nije termički tretirana.

Poslednjih godina, upotreba filmova hitozana u cilju sprečavanja propadanja voća i povrća koje je izazvano razvićem različitih gljiva nakon berbe, privuklo je veliku pažnju istraživača, prvenstveno zbog velikog otpora potrošača prema hrani koja može sadržati hemijske supstance za zaštitu biljaka ali i zbog povećanog broja patogena koji su postali tolerantni na upotrebljene fungicide. Hitozan ima sposobnost da smanjuje *in vitro* rast različitih vrsta gljiva sa izuzetkom *Zygomycetes* (Shahidi et al., 1999).

El Ghaouth et al. (1992 a), su uočili antifungalnu aktivnost hitozana na jagodama protiv *Botrytis cinerea* i *Rhizopus stolonifer*. Pri tom, ovi autori ističu da veću efikasnost imaju veće upotrebljene koncentracije hitozana.

Cuero et al. (1991), su uočili da N-karboksimetilhitozan smanjuje proizvodnju aflatoksina kod *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* za više od 90% dok je rast samih gljiva bio redukovano za 50%.

### 2.3.3. Filmovi na bazi proteina i polisaharida

U cilju postizanja boljih mehaničkih i barijernih osobina filmova, mogu se kombinovati različiti materijali. Filmovi koji su dobijeni kombinovanjem polisaharida i proteina nazivaju se kompozitni filmovi.

Kompozitni filmovi na bazi proteina i polisaharida mogu se pripremati od proteina i pektina (Liu et al., 2007; Piazza et al., 2009), skroba (Jagannath et al., 2003; Al-Hassan et al., 2012), hitozana (Ferreira et al., 2009; Jia et al., 2009; Di Pierro et al., 2007) i celuloze (Yoo i Krochta, 2011). Izrada kompozitnih filmova na bazi proteina i polisaharida može biti naročito interesantna za istraživače zato što su svi sastojci filma prirodni, bezbedni, zamenljivi i jeftini, a dobijeni filmovi imaju prihvatljive mehaničke osobine i biorazgradivost.

Kompozitni film na bazi hitozana i ekstrakta iz semenki grejpfruta pokazuje poboljšane mehaničke i barijerne karakteristike, u poređenju sa proteinskim filmom (Tan et al., 2015), i može se koristiti za sprečavanje razvoja plesni na hlebu. Prema rezultatima Zhang et al. (2015), dodatak vanilina može značajno poboljšati mehaničke karakteristike kompozitnih filmova hitozana, u poređenju sa samim filmom hitozana. Kompozitni filmovi pripremljeni od zeina i hitozana sa dodatkom fenolnih materija i dikarbonskih kiselina takođe pokazuju bolja mehanička svojstva i barijerne karakteristike (Cheng et al., 2015).

U prisustvu hitozana, proteini surutke pokazuju filmogena svojstva u kiseloj sredini i mogu naći primenu u pakovanju hrane (Ferreira et al., 2009). U cilju produženja održivosti Ricotta sira, Di Pierro i et al. (2010) su predložili primenu kompozitnog filma pripremljenog od hitozana i proteina surutke. Ovaj film je uspešno primenjen kao omotač za sir, u periodu od 30 dana.

### 2.4. *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* je prvobitno definisan kao monospecifičan i sastojao se od jedne vrste *Listeria monocytogenes* (McLauchlin, 1987). Ova bakterija je prvi put opisana od strane Murray et al., (1926) pod imenom *Bacterium monocytogenes*, koja je otkrivena kao uzročnik bolesti laboratorijskih životinja. Pažnju istraživača skrenula je na sebe tek

početkom osamdesetih godina prošlog veka usled pojave masovnih oboljenja. Jedna od većih epidemija listerioze nastala je kao posledica konzumiranja kupus salate. Kupus koji je upotrebljen za pripremu salate bio je kontaminiran ovom bakterijom, usled čega je i uočeno da je kontaminirana hrana glavni put prenosa ove bakterije iz okoline na ljude.

Danas je poznato da se rod *Listeria* sastoji od vrsta: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* (McLaughlin i Rees, 2009) i četiri nove vrste *Listeria rocourtiae* (Leclercq et al., 2010), *Listeria marthii* (Graves et. al., 2010), *Listeria fleischmannii* (Bertsch et al., 2013), i *Listeria weihenstephanensis* (Lang Halter et al., 2013).

Prema serološkoj tipizaciji, do sada je identifikovano 13 različitih serotipova *Listeria monocytogenes* na osnovu različite kombinacije 13 O i 3 H antigena. Od ovih serotipova, kao izazivači listerioza kod ljudi, u 95 % slučajeva su zastupljeni 1/2 a, 1/2 b i 4b serotip. Do sada poznati serotipovi u rodu *Listeria* su prikazani u **Tabeli 1** (Hitchins, 1998).

**Tabela 1. Različiti serotipovi u rodu *Listeria* (Hitchins, 1998)**

Listeria vrste	serotipovi
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, Un <sup>a</sup>
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, Un
<sup>a</sup> Un, neodređen	

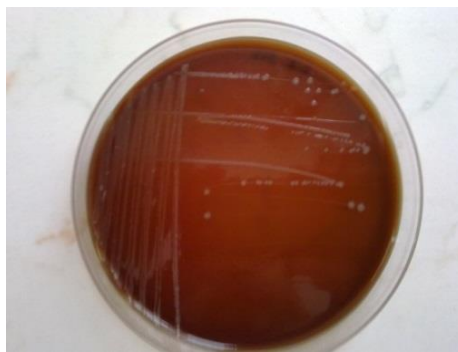
Slično drugim patogenim mikroorganizmima, *L. monocytogenes* ima sposobnost da proizvodi različite virulentne faktore koji oštećuju tkivo i na taj način omogućava ovom organizmu da napadne krvotok i izazove oboljenje kod domaćina. Patogenost u okviru roda *Listeria* je ograničena na dve vrste i to: *L. monocytogenes* i *L. ivanovii*. *L. monocytogenes* je odgovorna za praktično sve slučajeve listerioza kod ljudi, dok *L. ivanovii* izaziva listerioze kod životinja.

#### 2.4.1. Morfološke i fiziološke karakteristike *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna, kratka štapićasta bakterija dužine 0,5 do 2 $\mu$ m i prečnika 0,4 do 0,5 $\mu$ m sa zaobljenim krajevima. Pojavljuje se pojedinačno, ili u kratkim lancima, ne stvara kapsule ni spore. Ima peritrihalno raspoređene flagele i pokazuje karakterističnu pokretljivost i rast u vidu kišobrana pri temperaturama između 20 i 25°C. Ova pojava nije zapažena na temperaturi od 37°C. *L. monocytogenes* je katalaza pozitivna i oksidaza negativna bakterija. Ima sposobnost stvaranja beta-hemolize. Zona beta - hemolize ponekad je veoma uzana i ne prelazi ivice kolonija, tako da se može uočiti tek nakon njihovog uklanjanja.

**Tabela 2. Biohemijske karakteristike *L. monocytogenes***

<b>fakultativno anaerobna</b>
<b>zahtevaju relativno bogat medijum sa visokim procentom CO<sub>2</sub></b>
<b>rastu na 35 °C</b>
<b>mobilnost ( na 20-25°C)</b>
<b>ne-proteolitičke bakterije</b>
<b>katalaza test (+)</b>
<b>oksidaza test (-)</b>
<b>ne proizvode hidrogen sulfid</b>
<b>stvaraju kiselinu iz glukoze</b>
<b>metil red reakcija (+)</b>
<b>Voges-Proskauer reakcija (+)</b>
<b>ne proizvode indol</b>
<b>tolerisu visok sadržaj soli (10%)</b>
<b>ne koriste citrat</b>
<b>ureaza (-)</b>
<b>eskulin (+)</b>
<b>manitol (-)</b>
<b><math>\beta</math> hemoliza (+)</b>



**Slika 5. *L. monocytogenes* na krvnom agaru**

Osim gore navedenih osobina *L. monocytogenes*, značajne su i karakteristike dobijene na osnovu biohemijskih testova, koje su naročito važne za identifikaciju ove bakterije. Biohemijske karakteristike *L. monocytogenes* su prikazane u Tabeli 2 (Allerberger, 2003).

#### **2.4.2. Izolovanje i identifikacija *L. monocytogenes***

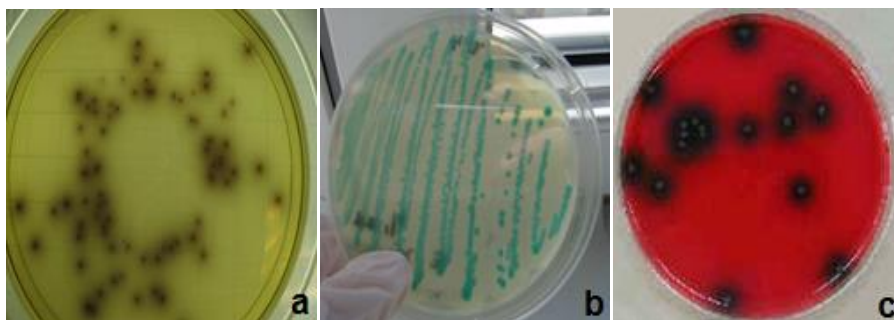
*L. monocytogenes* raste sporo na uobičajenim bakteriološkim podlogama i veoma je delikatan mikroorganizam za izolovanje. *Listeria sp.* se iz uzoraka obično ne izoluje direktnim zasejavanjem na selektivne podloge, već prethodnim zasejavanjem u podloge za selektivno obogaćenje.

Uspešnost izolacije zavisi od sposobnosti metode da pomogne rast malog broja ćelija *L. monocytogenes*, a u isto vreme da minimizira rast drugih mikroorganizama koji mogu biti prisutni u hrani. Skoro sve metode za izolaciju *L. monocytogenes* iz hrane koriste jednu ili obe karakteristike ove bakterije a to su: sposobnost *Listeria* da rastu na niskoj temperaturi i da pokazuju otpornost na antibiotike. Kod hrane koja se ispituje na prisustvo ovog organizma neophodno je da se prvo izvrši nakupljanje ćelija na 30-37°C u toku 24h u selektivnom bujonu za nakupljanje. Takođe su za izolaciju važne selektivne i diferencijalne čvrste podloge koje sadrže određene antimikrobne agense kao što su nalidiksinska kiselina, akriflavin i cikloheksimidin na koje je *L. monocytogenes* otporna. Najčešće čvrste podloga

za izolaciju ovog organizma su PALCAM agar, Oxford agar, modifikovani Oxford agar i ALOA agar.

U sastavu Oxford agara ulazi gvožđe amonijum citrat koji pomaže u diferenciranju *Listeria sp.* Obzirom da sve *Listeria* vrste hidrolizuju eskulin, dodatak jona gvožđa daje reakciju crnjenja kolonija i okolnog medijuma u kulturi koja sadrži eskulin-hidrolizujuće bakterije i rezultuje u formiranju 6,7-dihidroksikumarina koji reaguje sa jonima gvožđa. Selektivnost se postiže prisustvom litijum hlorida u podlozi. Visoka tolerancija prema NaCl se koristi da se primetno inhibira rast enterokoka. Selektivnost se povećava dodatkom različitih antimikrobnih aganasa bazi. Inkorporacija ovih agenasa u Oxford bazu kompletno inhibira gram negativne organizme i većinu gram pozitivnih nakon 24 h od inkubacije. Oxford baza sadrži cikloheksamid, kolistin sulfat, akriflavin, cefotetan i fosfomicin. Modifikovani Oxford medijum sadrži moksalaktam i kolistin metan sulfonat ili kolistin sulfat (Becton, 2003).

U slučaju PALCAM agara selektivnost se postiže prisustvom litijum hlorida, polimiksin B sulfata i akriflavina HCl, prisutnih u PALCAM bazi dok je u PALCAM antimikrobnom dodatku prisutan cefrazidim. Diferenciranost u slučaju PALCAM baze se postiže hidrolizom eskulina i fermentacijom manitola. Sve *Listeria* vrste hidrolizuju eskulin kojim se evidentira prisustvo crnih zona oko bakterija. Na ovoj podlozi osim *Listeria sp.* mogu rasti i enterokoke ili stafilokoke. Manitol i indikator fenol crveno se dodaju da bi se diferencirali maniol fermentujući sojevi enterokoka i stafilokoka od *L. monocytogenes* vrsta koje ne fermentuju manitol. Fermentacija manitola se detektuje promenom boje indikatora iz crvene u žutu oko kolonija, produkcijom kiselina (Becton, 2003).



**Slika 6. *L. monocytogenes* na: a) Oxford agaru, b) ALOA agaru i c) PALCAM agaru**



ALOA agar (Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti) omogućava diferencijaciju *L. monocytogenes* čak i u prisustvu drugih *Listeria* vrsta. Selektivnost podloge postiže se dodatkom litijum hlorida i selektivne antimikrobne mešavine koja sadrži ceftazidim, polimiksin B, nalidiksinsku kiselinu i cikloheksamid. Prisustvo glukoze u podlozi omogućava detekciju enzima  $\beta$ -glukozidaze koji je uobičajen za sve *Listeria* vrste. Zbog prisustva L- $\alpha$  -fosfatidilinozitola može se detektovati i enzim fosfolipaza C koji je prisutan kod *L. monocytogenes*. Zahvaljujući ovakvoj formulaciji podloge, moguće je razlikovati kolonije *Listeria* sp. koje rastu na ALOA agaru sa zeleno plavom bojom, od kolonija *L. monocytogenes* koje imaju zeleno plavu boju i okružene su neprozirnom zonom. ALOA agar je zbog ovakvih osobina preporučen od strane ISO 11290-1 Amd.1:2004 i ISO 11290-2 Amd.1:2004 za detekciju i prebrojavanje *L. monocytogenes* u namirnicama i stočnoj hrani.

#### **2.4.3. Rasprostranjenost *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* je široko rasprostranjena u okolnoj sredini i može biti izolovana iz različitih izvora. Njeno prvobitno stanište je zemljište i vegetacija gde se nalazi kao saprofit. Takođe se može naći i u stočnoj hrani, biljnom materijalu koji truli i vodi. Istraživanja ukazuju da 5-10% ljudi u populaciji mogu u svom intestinalnom traktu nositi ovaj organizam bez bilo kakvih zdravstvenih tegoba. Neke vrste domaćih i divljih životinja, kao i razne vrste ptica, riba i školjki mogu biti nosioci ove bakterije. Iz ovih izvora, *L. monocytogenes* veoma lako može dospeti i u prehrambene proizvode.

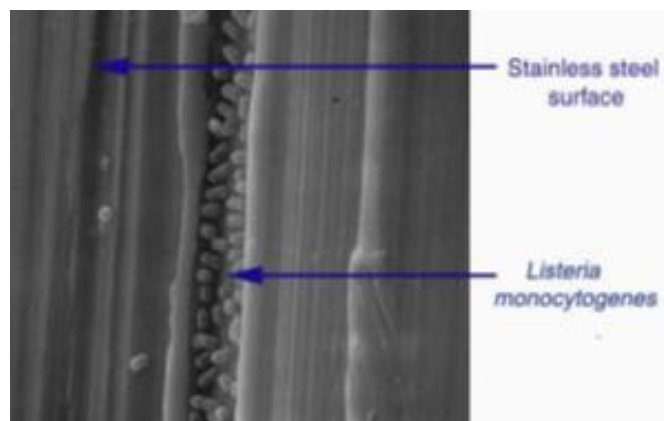
Za razliku od drugih bakterijskih vrsta koje zahtevaju uzak temperaturni opseg za rast, ova bakterija poseduje izuzetnu sposobnost preživljavanja na niskim temperaturama što joj dozvoljava razmnožavanje u hrani koja se čuva u frižideru. Iz tih razloga, iako je hrana propisno čuvana u frižideru, u njoj može biti prisutan ovaj patogeni organizam. Kada se radi o prehrambenim proizvodima, *L. monocytogenes* je naročito prisutna u nepasterizovanom mleku, mekim sirevima, sladoledu, sirovom povrću, fermentisanim kobasicama od sirovog mesa, gotovim isečenim proizvodima, piletini, dimljenoj ribi, zamrznutoj morskoj hrani itd. Naročito veliki rizik za zdravlje potrošača predstavlja sveže

povrće i voće, koje takođe može biti kontaminirano ovom bakterijom. Najčešće se *L. monocytogenes* može naći u svežem kupusu, zelenoj salati, celeru, paradajzu, krastavcima, krompiru, rotkvicama i drugom povrću (Popović i Nikšić, 2007)

Treba naglasiti da ova bakterija ima sposobnost da se uspešno razvija i u vakuum upakovanim i MAP proizvodima.

Za sve subjekte koji se bave preradom i proizvodnjom hrane, veoma bitno je da se u cilju eliminisanja ove patogene bakterije iz fabričkog okruženja, mora strogo primenjivati HACCP procedura. U fabričkom okruženju, *L. monocytogenes* se može naći na zidovima, podu, kanalizaciji, plafonu, opremi, hlađenju. U objekte za preradu hrane, ova bakterija se može uneti preko odeće i obuće radnika, zaprljanog sirovog materijala i poluproizvoda, vazduha, glodara ili ptica. Važan izvor kontaminacije su pre svega vlažne površine, vlažan vazduh, kao i ostaci hrane na opremi. Jedan od izvora kontaminacije ovom patogenom bakterijom mogu biti i biofilmovi.

Naročito veliki problem u širenju ovog patogena predstavlja postprocesna kontaminacija i unakrsna kontaminacija proizvoda. Izvori unakrsne kontaminacije ovom bakterijom su veoma kompleksni i mnogobrojni i mogu poticati iz različitih izvora kao što su rukavice i cipele radnika koji se bave preradom hrane, sve vrste opreme i radnih površina, uključujući čak i površine od nerđajućeg čelika. Kao jedan od primera faktora koji utiču na unakrsnu kontaminaciju naročito sečenih prehrambenih proizvoda Campos et al. (2009) navode i nakupljanje ostataka hrane na opremi za sečenje.



**Slika 7. *L. monocytogenes* na sečivu noža od nerđajućeg čelika**

#### 2.4.4. Patogenost *Listeria monocytogenes*

Kao posledica konzumiranja hrane koja je kontaminirana bakterijom *L. monocytogenes* kod ljudi dolazi do pojave oboljenja koje je poznato pod nazivom listerioza.

Listerioza je ozbiljna infekcija, koja predstavlja jedan od značajnijih problema u USA. Većina listerioza kod ljudi nastala je kao posledica konzumiranja *ready to eat* (RTE) hrane kao i različitih formulacija pripremljenih, gotovih salata, sireva ili svežeg povrća. Početni nivo kontaminacije *L. monocytogenes* u ovoj hrani je prilično nizak ali usled sposobnosti bakterije da se razvija na temperaturama frižidera, ona uspeva da se umnoži u hrani i izazove oboljenje kod ljudi.

Infektivne doze za *L. monocytogenes* još nisu poznate ali prema podacima McLaughlin et al. (2004); kao i Jensen et al. (2008), zavise od bakterijske vrste kao i od domaćina. Za zdravu ljudsku populaciju, hrana kod koje nivo ove bakterije ne prelazi 100 CFU/g predstavlja beznačajan rizik. Zato se prema EU mikrobiološkim kriterijumima za RTE hranu na tržištu zahteva da sadrži manje od 100 CFU/g (EC, 2005; EFSA, 2013). Ova preporuka se zasniva na epidemiološkim podacima koji ukazuju da *L. monocytogenes* predstavlja mali rizik za zdrave osobe kada je prisutna u koncentraciji nižoj od 100 CFU/g. Zaključeno je da unošenje u organizam malih količina *L. monocytogenes* (< 100 CFU/g) ima veoma malu verovatnoću da izazove oboljenje kod ljudi, čak i među rizičnom grupom populacije. Prema tome, mere kontrole koje imaju za cilj da spreče pojavu visokog nivoa kontaminacije hrane, u vreme njene potrošnje, imale bi najveći uticaj na smanjenje pojave listerioze kod ljudi.

Ako se kontaminirana hrana nađe na tržištu, tada zdravstveni zvaničnici ukazuju na potencijalnu mogućnost kontaminacije prehrambenih proizvoda bakterijom *L. monocytogenes*. U cilju sprečavanja epidemije listerioze preporučuje se povlačenje takvih proizvoda iz prodaje. Povlačenje kontaminirane hrane iz prodaje je uvek dobrovoljno. Međutim, ukoliko neka kompanija odbije da kontaminirane prehrambene proizvode povuče sa tržišta, FDA (Food and Drug Administration) i FSIS (Food Safety and Inspection Service) imaju zakonsko ovlašćenje da te proizvode zaplene. Opozivanje hrane klasifikovano je od strane FSIS i FDA u tri klase, već prema nivou opasnosti.

FDA klasifikacija razlikuje (FDA, 2014):

- Klasu I: Opasni ili defektni proizvodi za koje se predviđa da mogu da izazovu ozbiljne zdravstvene problem ili smrt kod potrošača,
- Klasa II: Proizvodi koji mogu izazvati privremene ili neznatne zdravstvene probleme,
- Klasa III: Proizvodi koji najverovatnije neće izazvati štetne posledice po zdravlje potrošača (manji defekti ambalaže, nepravilno etiketiranje i dr).

Pravi podaci o učestalosti listerioze nisu poznati jer kod prosečne zdrave osobe ovo oboljenje stvara blage simptome slične gripu, dok su kod rizične grupe stanovništva glavne kliničke manifestacije listerioze sepsa i meningitis ili meningoencefalitis. Bolest uglavnom pogađa starije osobe, trudnice, novorođenčad i odrasle sa oslabljenim imunim sistemom. U 5 – 10% slučajeva, listerioza se pojavljuje u manje tipičnim oblicima, kao što su endokarditis, pneumonija, pleuritis, hepatitis, peritonitis, apsces, artritis, osteomijelitis, konjunktivitis ili primarna kožna listerioza (Vazquez-Boland et al., 2001).

Međutim i zdrave osobe takođe mogu da obole od listerioze. Prema podacima Bubonja et al. (2007), ljudi tokom života hranom više puta unose bakteriju *L. monocytogenes* u probavni sistem. Nakon ingestije kontaminiranih namirnica, dolazi do kolonizacije creva domaćina koja obično prolazi bez simptoma bolesti. Unos većega broja bakterija u probavni sistem, može dovesti do pojave neinvazivnog febrilnog gastroenteritisa kod inače zdravih osoba. Listerijski gastroenteritis u većem broju slučajeva traje približno dva dana a potom prolazi bez ozbiljnijih posledica. Budući da se *L. monocytogenes* rutinski ne traži u stolici, nije poznato koliko se ukupno slučajeva gastroenteritisa može pripisati infekciji tom bakterijom.

Obično osobe sa listeriozom imaju povišenu temperaturu i bol u mišićima, a prethode im dijareja i druge gastrointestinalne tegobe. Pored groznice i bolova u mišićima mogu se javiti ukočen vrat, glavobolja, konfuzija, gubitak ravnoteže i konvulzije. Simptomi variraju u zavisnosti od zaražene osobe.

Trudnice najčešće imaju groznicu i druge nespecifične simptome kao što su malaksalost, umor i bolovi. Međutim, infekcija u toku trudnoće može dovesti do pobačaja, mrtvorodenja ili rođenja bolesnog deteta. Zavisno od toga da li je do infekcije došlo u trudnoći, tokom trudnoće ili nakon porođaja, infekcije kod novorođenčadi mogu se podeliti

na rane i na kasne. Ako je do infekcije došlo tokom trudnoće, bolest se kod novorođenčeta može ispoljiti odmah nakon rođenja septičnim oblikom bolesti (sindrom *granulomatosis infantiseptica*). Kasna novorođenačka listerioza ispoljava se kod novorođenčeta tokom prve do treće nedelje života i verovatno nastaje kao posledica udisanja kontaminirane plodove vode tokom porođaja. Kasna novorođenačka listerioza češće se ispoljava kao febrilno stanje praćeno meningitisom, a u određenom broju slučajeva kao gastroenteritis i pneumonija. Iako je procenat smrtnosti kasne novorođenačke listerioze (do 20%) niži u odnosu prema kongenitalnoj infekciji (30%), posledice kasne listerioze poput hidrocefalusa i psihomotorne retardacije, mogu biti teške i trajne (Pattarino et al., 2006).

Kod starijih osoba i osoba sa oslabljenim imunitetom, najčešće kliničke manifestacije ovog oboljenja su sepsa i meningitis.

Mnogim ispitivanjima zaključeno je da u kliničkim slučajevima listerioza preovlađuju određeni serotipovi *L. monocytogenes*. Prema podacima McLauchlin (1987), najčešće zastupljeni serotipovi su 4b, 1/2a i 1/2b. Serotip koji se najčešće nalazi u slučajevima listerioza kod ljudi je 4b i izgleda da on poseduje virulentne osobine daleko veće od drugih serotipova.

U Americi je za 2010. godinu, zabeleženo 568 slučajeva listerioza, u 41. državi (CDC a). Od tog broja, 13% su listerioze kod trudnica. Smrtni ishod oboljenja je iznosio 20%. Prosečna starost pacijenata je bila 72. godine a kod trudnica 28. godina. Od ukupnog broja trudnica sa listeriozom, 19% listerioza povezanih sa trudnoćom je dovelo do smrti fetusa dok je 6% živo rođene dece sa listeriozom umrlo.

Serotip *L. monocytogenes* koji je izolovan u najvećem broju slučajeva je 4 b (49 %) a zatim slede 1/2a sa 26% i 1/2b sa 16%.

U 2011. godini, 621. slučaj listerioze je registrovan u 47. država, a od tog broja, listerioza kod trudnica je bila zastupljena sa 10 %. Za ovu godinu, stopa smrtnosti je iznosila 22%. Prosečna starost pacijenata bila je 71. a kod trudnica 29. godina. Osim toga, 26% listerioza kod trudnica je uzrokovalo smrt fetusa, dok je 4% živo rođene dece sa listeriozom umrlo (CDC a).

Analizom podataka koji su bili dostupni na sajtovima, Silk et al. (2012) su istraživali trovanja hranom koja je izazvala *L. monocytogenes*. U periodu od 2004. do 2009.

godine identifikovano je 762. slučaja listerioze. Od tog broja, 18% slučajeva bilo je sa smrtnim ishodom. Najveća smrtnost uočena je kod novorođenčadi i prevremeno rođenih beba dok kod starijih osoba postoji veća mogućnost izlječenja. Od 610 izolata koji su podvrgnuti serotipizaciji, serotip 4 b je bio zastupljen sa 48%, dok je 1/2 a bio zastupljen sa 29% a 1/2b sa 18%.

U periodu od 2009. do 2011. godine Silk et al. (2013), zabeležili su 1561. slučaj listerioze sa stopom smrtnosti od 21%. Većinu obolelih čine osobe starije od 65. godina (58%) kao i trudnice (14%). Najmanje 74% obolelih koji su mlađi od 65. godina, imalo je neko oboljenje uz upotrebu odgovarajuće terapije, oslabljen imunitet ili maligno oboljenje. Na osnovu ovih podataka, može se reći da je listerioza moguća kod visoko rizičnih grupa kao što su trudnice, starije osobe i osobe sa oslabljenim imunitetom.

**Tabela 3. Slučajevi listerioze u periodu od 2009. do 2015. godine u Americi**

Godina	Broj obolelih	Vrsta hrane	Literaturni izvor
2009	26	Meksički sir	Silk et al. 2013
2010	14	Hog head cheese	<a href="http://www.about-listeria.com">http://www.about-listeria.com</a>
	2	Suši rolnice	Silk et al. 2013
	4	Nepoznat uzročnik	Silk et al. 2013
	10	Sveže sečeni celer	<a href="http://www.about-listeria.com">http://www.about-listeria.com</a>
	6	Meksički sir	Silk et al. 2013
2011	2	Nepoznat uzročnik	Silk et al. 2013
	2	Sir sa vlašcem	Silk et al. 2013
	147	Sveže dinje	<a href="http://www.cdc.gov">http://www.cdc.gov</a>
	2	Meksički sir	Silk et al. 2013
	15	Stari sir sa plavim plesnima	Silk et al. 2013
2012	22	Ricotta cheese	<a href="http://www.cdc.gov">http://www.cdc.gov</a>
		Dimljeni losos	<a href="http://www.about-listeria.com/">http://www.about-listeria.com/</a>
2013	6	Sir sa tartufima	<a href="http://www.cdc.gov">http://www.cdc.gov</a>
2013		Svinjske kobasice	<a href="http://www.bbc.com">http://www.bbc.com</a>
2014		Mlečni proizvodi	<a href="http://www.cdc.gov">http://www.cdc.gov</a>
2015		Zelena salata	<a href="http://www.cdc.gov">http://www.cdc.gov</a>

Terapija kod listerioze podrazumeva upotrebu odgovarajućih antibiotika. Najčešće se primenjuje ampicilin, baktrim i tetraciklin. Manji procenat sojeva *L. monocytogenes* može biti otporan na tetracikline, pa je zato najbolje da se izbor antibiotika vrši na osnovu

antibiograma. Pošto ćelije *L. monocytogenes* žive unutar makrofaga, lečenje može biti otežano a period lečenja različit. Obično, trudnice se leče do dve nedelje, novorođenčad dve do tri nedelje, osobe sa meningitisom tri nedelje, osoba sa apscesom mozga šest nedelja i osobe sa endokarditisom četiri do šest nedelja.

Osim posledica po zdravlje potrošača, listerioza izaziva i značajne ekonomske gubitke. 2002. godine, po veličini druga kompanija za preradu živinskog mesa u US bila je primorana da povuče iz prodaje više od 13000 metričkih tona rashlađene i smrznute RTE ćuretine i pilećih proizvoda, zbog sumnje da su kontaminirani *L. monocytogenes*. To je bio najveći opoziv prerađevina od mesa u američkoj istoriji (FSIS, 2002).

Ekonomске i zdravstvene posledice epidemija listerioze, mogle bi biti svedene na minimum, primenom odgovarajuće prakse i standarda u prehrambenoj industriji. Brojne mere za kontrolu *L. monocytogenes* u lancu ishrane obuhvataju dobru higijensku praksu, dobru proizvođačku praksu i implementaciju HACCP koncepta. Primena ovog koncepta u prehrambenim preduzećima kao i proizvodnja zdravstveno bezbedne hrane, za sve zaposlene treba da bude zakonska obaveza (EC, 2002; EC 2004).

#### **2.4.5. Uticaj temperature na rast *L. monocytogenes***

Temperatura je jedan od najvažnijih činilaca za život mikroorganizama. Optimalna temperatura za razvoj *L. monocytogenes* je na 30-37°C, mada ona za razliku od drugih patogenih mikroorganizama može uspešno rasti u opsegu temperatura od 0 do 45 °C. Brzina rasta zavisi od visine temperature, tako da u temperaturnom opsegu od -0,4 do 5°C raste za sedam dana; od 6 do 10°C za dva dana, a u rasponu od 11 do 21°C ova vrsta raste za 12h (Beales, 2004).

*L. monocytogenes* je zbog svoje sposobnosti razvića na niskim temperaturama (4°C), jedan od patogena koji ima veliku važnost za kvalitet sveže sečenog, minimalno prerađenog povrća za čije skladištenje se upravo primenjuju ovakve niske temperature. Ova bakterija takođe ima sposobnost rasta i kada temperatura padne ispod 1°C a preživljava i temperaturu zamrzavanja (Seeliger i Jones, 1986). Sposobnost opstanka na niskoj temperaturi zavisi od koncentracije soli, pH, kiselosti hrane, starter kulture i druge

kompetitivne mikroflore. Rast *L. monocytogenes* na niskim temperaturama ispod 5°C je zabeležen u mleku, mesu, jajima i povrću.

Sposobnost preživljavanja *L. monocytogenes* na niskim temperaturama je bio predmet istraživanja mnogih naučnih studija. U jednoj od njih se ističe da jednu od glavnih uloga u preživljavanju ove bakterije na niskim temperaturama imaju fosfolipidi ćelijske membrane. Naime, pri sniženju temperature ispod optimuma na np. 5°C dolazi do promene odnosa između ostataka zasićenih masnih kiselina C<sub>15:0</sub> i C<sub>17:0</sub> u fosfolipidima u korist masnih kiselina sa manjim brojem C atoma tj C<sub>15:0</sub> (Russell et al., 1995). Smanjenjem dužine lanaca smanjuje se i mogućnost interakcije među njima koje bi dovele do uređenosti sistema i gel stanja. Ovako se održava fluidnost membrane. Smatra se da se isti rezultat postiže i sa povećanjem količine nezasićenih masnih kiselina C<sub>18:1</sub> (Annous et al., 1997). Osim fosfolipida značajnu ulogu ima i transportni sistem kroz membranu koji je otporan na niske temperature i obezbeđuje dovoljne količine unutarćelijskih materija neophodnih za preživljavanje *L. monocytogenes*.

Istraživanjima je dokazano da se sniženjem temperature kod *Listeria monocytogenes* aktiviraju takozvani *shock* proteini koji između ostalog preuzimaju ulogu u inicijaciji translacije koja prestaje na niskim temperaturama (Phan-Tham i Gorman, 1995). Ovi proteini utiču još i na povećanu tolerantnost prema visokim temperaturama.

*L. monocytogenes* može da raste u svežem povrću i proizvodima od povrća koji su namenjeni ljudskoj ishrani a skladište se na niskim temperaturama. Na osnovu studije Connor et al. (1986) zaključeno je da *L. monocytogenes* opstaje u sirovom sečenom kupusu 5 dana skladišten na temperaturi od 5°C. Zelena salata se takođe smatra kao pogodan medijum za opstanak ove bakterije. Prema rezultatima naučne studije koja se bavila ispitivanjem opstanka *Listeria monocytogenes* u pakovanim sirovim salatama, zaključeno je da je moguć rast ove patogene bakterije u salatama skladištenim na 4, 5 i 6,5 °C (Beuchat, 1996 a).

Sposobnost opstanka i rasta *L. monocytogenes* na temperaturi skladištenja koja se koristi za sveže sečene, minimalno prerađene plodove povrća obavezuje na primenu nekog dodatnog faktora, koji deluje na suzbijanje rasta ove bakterije kao i pooštrene higijenske mere u toku prerade i skladištenja ovih namirnica.



#### 2.4.6. Uticaj pH vrednosti na rast *L. monocytogenes*

Optimalna pH vrednost za rast *L. monocytogenes* je pH 6-8 mada može da raste na laboratorijskim podlogama u pH intervalu od 4,0 - 9,4 (Kim et al., 1995) Iako je *L. monocytogenes* osetljivija na kiseline nego na baze, acidotolerantni sojevi ove bakterije mogu da rastu u jako niskim pH sredinama što predstavlja veliki problem za industriju hrane. Zbog tolerancije prema kiselinama *L. monocytogenes* u nekim slučajevima može da preživi u hrani sa niskim pH vrednostima (na primer: jogurt, sir, sok od narandže) i više nedelja. Prema podacima Downes i Ito, (2001) *L. monocytogenes* može da preživi 21 dan, pa i više od 90 dana u soku od narandže sa pH vrednosti 3,6 i 5,8 ponaosob, tokom skladištenja na 4°C.

U studijama koje su se bavile proučavanjem sposobnosti preživljavanja bakterija pri niskim pH vrednostima, navodi se da su glavni adaptivni mehanizmi koji omogućavaju opstanak mikroorganizama u ovim stresnim uslovima bazirani na održavanju pH homeostaze ili na sposobnosti povratka citoplazmatske pH na neutralnu vrednost (Hall et al., 1995).

Bakterije mogu preživeti u kiseloj sredini regulacijom citoplazmatske pH u procesu koji se zasniva na kontroli prolaska katjona kroz membranu. Sposobnost održavanja citoplazmatske pH oko neutralne vrednosti (pH homeostaza) može biti onesposobljena sniženjem spoljašnje pH što vodi ka smrti ćelije. Mogućnost mikroorganizama da održe citoplazmatsku pH oko neutralne vrednosti je omogućena kombinacijom aktivnog i pasivnog mehanizma homeostaze (Hall et al., 1995; Brown i Booth, 1991.)

Eksperimentima je dokazano da *L. monocytogenes* ima sposobnost boljeg preživljavanja na niskim pH vrednosti ako se njima postepeno izlaže. Ravishankar i Harrison (1999) su postupnim izlaganjem *L. monocytogenes* različitim pH vrednostima, pokazali da sojevi koji su bili postepeno izlagani sniženoj pH vrednosti pokazuju i do 2 log veće preživljavanje nego sojevi koji su bili direktno izloženi pH 4,0. Potvrda ovome su i druge studije u kojima su ćelije *L. monocytogenes* čuvane u sredini sa pH 5 do 6 a nakon nekog vremena izlagane pH 3,5. Ovako acidno-adaptirane ćelije su bolje opstajale u kiseloj hrani nego ćelije bez predhodne adaptacije (O'Driscoll et al., 1996).

U svom radu, Doyl (1999) navodi da niske vrednosti pH sredine imaju negativan uticaj na rast *L. monocytogenes* u hrani, ali na to značajno utiče i tip kiseline, temperatura kao i druga antimikrobna sredstva koja mogu biti prisutna u hrani. Ispitivanjem uticaja sirćetne, mlečne, limunske i hlorovodonične kiseline na smanjenje broja *L. monocytogenes* uočeno je da najveću efikasnost od svih kiselina ima upravo sirćetna kiselina (Young i Foegeding, 1993; Ita i Hutkins, 1991). U suzbijanju ovog organizma jabučna kiselina nije efikasna isto kao i mlečna kiselina, a limunska i mlečna kiselina su manje efikasne od sirćetne kiseline. Podešavanjem pH vrednost sa različitim kiselinama, došlo se do zaključka da pri istim pH vrednostima nivo preživljavanja ove bakterije zavisi od upotrebene kiseline kao i od njene koncentracije. U odnosu na njihovu antimikrobnu aktivnost, Podolak et al. (1995) su kiseline rasporedili sledećim redosledom:

sirćetna >mlečna >limunska >jabučna> hlorovodonična

Takođe je zapaženo da je inhibitorni efekat kiselina veći na nižim temperaturama (Doyle, 1999).

#### **2.4.7. Uticaj aw vrednosti na rast *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* spada u grupu mikroorganizama koji su otporni na niže aw vrednosti, a posebno je karakterističan njen opstanak u sredini sa visokim procentom NaCl. *L. monocytogenes* je jedan od patogena koji može da raste pri aw vrednostima od 0,90 na temperaturi od 30°C sa dodatkom glicerola, na aw 0,92 sa dodatkom NaCl i na aw 0,93 sa dodatkom saharoze (Jay, 2000).

Ovaj organizam može uspešno da raste u podlozi koja sadrži 10 % NaCl, mada je njegova halotolerantnost ispitana u mnogim drugim radovima. Hudson (1992), navodi da *L. monocytogenes* lako može da preživi na temperaturi od 10°C i u rastvoru koji sadrži i 26% soli. Iako je ova bakterija halotolerantna, dodatak NaCl medijumu za gajenje ili hrani se ipak smatra stresnim faktorom za opstanak *L. monocytogenes* i u kombinaciji sa drugim stresnim faktorima pokazuje dobre rezultate u inhibiciji rasta ove patogene bakterije (Buchanan et al., 1989).

Rast na niskim aw vrednostima izaziva promene na membranskim lipidima ćelija *L. monocytogenes*. Za razliku od efekata na temperaturne promene, u odgovoru na povećanu

koncentraciju soli promene se dešavaju na polarnim glavama membranskih lipida. Glavne promene u sastavu membranskih lipida, su u povećanju proporcije anjonskih lipida (difosfatidilglicerol i fosfatidilglicerol) ka neutralnim lipidima (fosfatidiletanolamin). U radovima Russell et al. (1995), se navodi da dodatkom 2% NaCl u medijum za rast, *L. monocytogenes* reaguje povećanjem odnosa difosfatidilglicerol/fosfatidilglicerol u poređenju sa kontrolom.

#### **2.4.8. Uticaj etarskih ulja na rast *L. monocytogenes***

Od ranije je poznato da etarska ulja različitih začinskih i lekovitih biljaka mogu imati izraženu antimikrobnu aktivnost. Pošto je reč o prirodnim antimikrobnim sastojcima biljaka, etarska ulja pobuđuju stalnu pažnju istraživača, naročito u poslednje vreme kada je kod potrošača probuđena svest o zdravoj hrani bez hemijskih konzervanasa.

Etarska ulja predstavljaju specifične, najčešće tečne produkte biljnog tkiva koji se karakterišu veoma snažnim mirisom. To su složene smeše različitih isparljivih monoterpena, seskviterpena i fenilpropanskih, aromatičnih jedinjenja.

Etarska ulja su lokalizovana u različitim delovima biljaka, tako da se kao droga za njihovo dobijanje mogu koristiti različiti delovi biljke (cvast kamilice, pupoljak cveta karanfilića, list nane i matičnjaka, kora cimetovog drveta, koren peršuna, rizom perunike, plod anisa i morača, odnosno seme morskog oraščića). Interesantno je da etarska ulja lokalizovana u različitim delovima iste biljke, mogu biti sličnog sastava, ali se mogu i značajno razlikovati (etarsko ulje zelenog ploda, zrelog ploda, listova i korena peršuna razlikuju se po dominantnim sastojcima). Inače, aromatične droge sadrže najčešće male količine ulja, manje od 1%. Retki su primeri droga, kao što je pupoljak karanfilića, koji sadrži preko 15% etarskog ulja (Kovačević, 2004).

Količina i sastav etarskog ulja neke biljne vrste može biti promenljiv i zavisi od većeg broja različitih faktora kao što su genotip, starost i vegetativna faza razvoja biljke (što je važno za definisanje optimalnog vremena prikupljanja biljnog materijala), klimatski uslovi, sastav zemljišta, način obrade biljnog materijala i način izolacije etarskog ulja (Angioni et al., 2006).

Najjednostavniji način da se etarska ulja izoluju iz biljnog materijala je destilacija vodenom parom. Ovaj postupak se koristi već godinama. Tokom destilacije dolazi do zagrevanja i delimičnih, hemijskih promena pojedinih sastojaka etarskog ulja. Pored destilacije, vekovima se etarsko ulje agruma dobija presovanjem, odnosno ceđenjem svežeg tkiva. Osim toga, u cilju izdvajanja etarskog ulja iz biljnog materijala mogu se koristiti i metode sa tečnim ugljendioksidom kao i primena mikrotalasa.

#### **2.4.8.1. Fizičke osobine etarskih ulja**

Na sobnoj temperaturi, etarska ulja su najčešće tečnosti, ređe imaju viskoznu ili polučvrstu konzistenciju. Lako su pokretljiva, bezbojna ili slabo obojena, uglavnom bistra. Već na nižim temperaturama, pojedini sastojci etarskog ulja isparavaju i zato ulja imaju specifičan, prijatan ili neprijatan miris. Etarska ulja su lipofilna, rastvaraju se u nepolarnim organskim rastvaračima, etanolu, mastima i masnim uljima, a ne rastvaraju se u vodi.

Relativna gustina etarskih ulja može biti manja ili veća od 1 ali je neuporedivo manji broj etarskih ulja čija je relativna gustina veća od 1. Najznačajniji parametar kvaliteta etarskih ulja su vrednosti indeksa refrakcije i ugla skretanja ravni polarizovane svetlosti. Specifičnost etarskih ulja je da nemaju tačno definisanu temperaturu ključanja. Pošto su to smeše različitih jedinjenja, svako od njih isparava na svojoj temperaturi ključanja. Tako, etarska ulja frakciono ključaju u intervalu od 150 do 350°C.

#### **2.4.8.2. Hemijski sastav etarskih ulja**

Etarska ulja su složene prirodne mešavine koje mogu sadržati od 20 do 60 komponenata u potpuno različitim koncentracijama. Ona se karakterišu prisustvom dve ili tri glavne komponente koje su zastupljene u veoma visokim koncentracijama (20-70%) u poređenju sa drugim komponentama koje su prisutne u količini tragova. Prema Bakkali et al. (2008) karvakrol (30%) i timol (27%) su glavne komponente etarskog ulja *Origanum compactum*, linalol (68%) je glavni sastojak etarskog ulja *Coriandrum sativum*, 1,8-cineol (50%) je glavni sastojak etarskog ulja *Cinamomum camphora*, a mentol (59%) i menton (19%) su glavni sastojci etarskog ulja *Mentha piperita*.

Glavni sastojci etarskih ulja su dve različite klase jedinjenja: terpeni i fenilpropanski derivati (Pichersky et al., 2006). U okviru terpenske frakcije, zastupljeni su isparljivi monoterpeni i seskviterpeni.

Monoterpeni se javljaju u obliku acikličnih, mono- ili bicikličnih, alifatičnih i aromatičnih struktura. Od monoterpena, najčešće prisutni sastojci etarskih ulja su: p-cimen, sabinen, karvakrol, timol,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, geraniol i dr. Od seskviterpena najzastupljeniji sastojci etarskih ulja su azulen,  $\beta$ -bisabolen, farnezen,  $\beta$ -kariofilen i dr.

Aromatični, fenilpropanski sastojci u etarskim uljima su zastupljeni u mnogo manjim količinama. Najčešće su to aril- ili propenilfenoli i aldehidi. Od aromatičnih komponenata, najčešće su zastupljeni cinamaldehyd, eugenol, anetol, kavikol, estragol, apiol i dr.

Usled njihovih baktericidnih i fungicidnih osobina, etarska ulja nalaze široku primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao alternative različitim sintetičkim hemijskim proizvodima. Etarska ulja mogu delovati protiv velikog broja patogenih bakterija kao što su *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i mnoge druge (Schmidt et al., 2005; Jirovetz et al., 2005; Burt, 2004). Prema Penalver et al. (2005) etarska ulja timijana i origana mogu inhibirati rast *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* i *Salmonella typhimurium* pri čemu inhibicija direktno zavisi od sadržaja fenolnih komponenti karvakrola i timola. Etarska ulja sa visokim sadržajem timola i karvakrola kao što su origano, timijan i čubar, više utiču na inhibiciju rasta G (+) nego G (-) patogenih bakterija (Nevas et al., 2004). Međutim, etarsko ulje *Achillea clavennae* ispoljava snažno dejstvo protiv G (-) patogena *Haemophilus influenza* i *Pseudomonas aeruginosa* dok je G (+) *Streptococcus pyogenes* bila veoma otporna na etarsko ulje (Skočibušić et al., 2004).

Do sada je poznato oko 3000 etarskih ulja od čega 300 nalazi primenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i parfemskoj industriji, poljoprivredi kao i u proizvodnji kozmetičkih i sanitarnih preparata. Prema Bakkali et al. (2008) d-limonen, geranilacetat ili d-karvon se koriste u proizvodnji krema, parfema i sapuna, kao aditivi za korekciju ukusa i mirisa prehrambenih proizvoda, kao mirisne komponente pri proizvodnji sredstava za

održavanje domaćinstva itd. Osim toga, etarska ulja nalaze primenu u aromaterapiji, koriste se pri masaži u kombinaciji sa biljnim uljima i kao sastojak različitih kupki.

Neka etarska ulja pokazuju naročite medicinske osobine usled čega se mogu koristiti u sprečavanju kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze, holesterola i tromboze. Etarska ulja i njihove pojedine aromatične komponente pokazuju aktivnost suzbijanja raka kada su testirani na brojnim ćelijama ljudskog raka uključujući rak mozga, rak debelog creva, rak jetre, plućne tumore, rak dojke, leukemiju i dr. Među komponentama etarskih ulja koje su se pokazale aktivne u suzbijanju različitih tipova raka treba izdvojiti  $\alpha$ -bisabolol iz kamilice, geraniol, d-limonen iz kore citrusa, dialil sulfid iz etarskog ulja belog luka i dr (Edris, 2007).

Takođe je značajno istaći da etarska ulja ispoljavaju izraženu antioksidativnu sposobnost. Etarska ulja bosiljka, cimeta, karanfilića, oraščića i timijana imaju proverene antioksidativne osobine u DPPH radikalnoj metodi na sobnoj temperaturi (Tomaino et al., 2005). Po redosledu efikasnosti oni se mogu rasporediti na sledeći način: karanfilić >> cimet >> oraščić >> bosiljak >> origano >> timijan. Zbog svojih antioksidantnih osobina, etarsko ulje *Melaleuca alternifolia* je predloženo kao prirodni antioksidans, alternativa za BHT (butilhidroksi toluen) (Kim et al., 2004).

Zhang et al. (2009) su proučavali antimikrobna svojstva četrnaest različitih etarskih ulja (karanfilić, oregano, ruzmarin, biber, oraščić, sladić kurkuma, anis, cimet, komorač, kardamon, angelika i dr.) protiv bakterija *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* i *Lactobacillus sake*. Njihovi rezultati su pokazali da pojedinačni ekstrakti karanfilića, ruzmarina, cimeta i sladića ispoljavaju snažnu antibakterijsku aktivnost, ali smeša ekstrakta ruzmarina i sladića je najsnažnije inhibirala sve četiri vrste bakterija. Ovi biljni ekstrakti imaju široku primenu u prehrambenoj industriji i nose GRAS oznaku, usled čega se mogu smatrati prirodnim konzervansima.

Primena etarskih ulja i njihovih fenolnih komponenti u cilju suzbijanja rasta *L. monocytogenes* je veoma značajna, obzirom da se radi o patogenoj bakteriji koja dobro podnosi niske temperature, kiselu sredinu i povećanu koncentraciju soli. Antilisterijski efekat etarskih ulja zavisi uglavnom od upotrebene koncentracije, sastava i pH hrane, temperature skladištenja ali i prirode mikroorganizma. Na osnovu literaturnih podataka

može se videti da antilisterijski efekat pokazuju etarska ulja različitih biljnih vrsta kao što su timijan, cimet, karanfilić, ruzmarin, origano, majoran itd. Ispitivanjem antilisterijske aktivnosti etarskih ulja 32 biljke koje se koriste u prehrambenoj industriji Aureli et al. (1992) nalaze da su inhibitornu aktivnost pokazala ulja cimeta, karanfilića, origana, pimente i timijana. Prema ovom istom autoru, etarska ulja timijana u usitnjenom svinjskom mesu pokazuju 2 log redukcije ćelija *L. monocytogenes*. Prema podacima Klaus et al. (2009) izraženu antilisterijsku aktivnost pokazuju etarska ulja majorana, timijana, kima i korijandera. Proučavanjem opstanka *L. monocytogenes* u gotovim salatama u prisustvu etarskog ulja mente Tassou et al. (1995) beleže opadanje populacije ovog patogenog organizma u toku 7 dana na temperaturama od 10 i 4°C.

Ispitivanje antilisterijskog efekta etarskih ulja je vršeno najčešće u podlogama za gajenje i u različitim modelima hrane i to pre svega u mesu. Rezultati su pokazali da je osetljivost *L. monocytogenes* na etarske komponente uglavnom manja u mesu i proizvodima od mesa nego u podlozi za gajenje, a pozitivnost dobijenih rezultata pokazuje opravdanost za istraživanja i u drugim vrstama namirnica.

Ispitivanjem antilisterijskog efekta ekstrakta origana (*Origanum vulgare*) kao i timola i karvakrola (dve glavne fenolne komponente ekstrakta origana) na *L. monocytogenes* u bujonu i mesu rezultati Seaberg et al. (2003) su pokazali da je dovoljno 150-200 ppm čistog timola ili karvakrola da bi se značajno suzbio rast *L. monocytogenes* u bujonu dok je u slučaju ekstrakta origana bilo potrebno 1200 ppm. Za razliku od ovih rezultata, 800 ppm ekstrakta origana je uspešno suzbilo rast *L. monocytogenes* u uzorku mesa, za razliku od iste količine čistog karvakrola. Navodi se i da su prirodno izolovana jedinjenja efikasnija nego sintetička.

Kombinovanje različitih limitirajućih faktora kao što su: niska temperatura skladištenja, niska pH vrednost, snižena aw vrednost namirnica, odgovarajuća koncentracija NaCl i dodatak etarskih ulja ili njihovih fenolnih komponenti, može dati mnogo bolje rezultate u kontroli rasta *L. monocytogenes* u hrani, nego korišćenje samo jednog limitirajućeg faktora.

### 3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj istraživanja u okviru ove disertacije je proizvodnja jestivih biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi hitozana i želatina i ispitivanje antimikrobnih svojstava ovako dobijenih filmova. Sa porastom ekološke svesti potrošača i potrebom za zdravom hranom, sintetička antimikrobna sredstva gube na atraktivnosti, a primat zauzimaju prirodna sredstva koja mogu da obezbede produženu trajnost prehrambenih proizvoda.

Upotreba jestivih filmova i antimikrobnih agenasa koji se mogu inkorporirati u filmove, može da doprinese dobijanju bezbednijih proizvoda. Upotreba ovih filmova u proizvodnji hrane omogućava da proizvodi budu mikrobiološki stabilni uz poboljšana senzorna svojstva i produžen rok trajanja.

Za ostvarenje ovih ciljeva postavljeni su sledeći zadaci:

1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja timijana, mente, bosiljka, lovora, peršuna, karanfilica i ruzmarina na rast sojeva *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti različitih mešavina etarskih ulja na rast sojeva *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
3. Ispitivanje preživljavanja sojeva *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom, minimalno prerađenom povrću (kupusu, šargarepi, crnoj rotkvi i njihovim mešavinama), na temperaturi od 4°C.
4. Određivanje ukupnog broja ispitivanih bakterijskih sojeva *L. monocytogenes*, u uzorcima sveže sečenog povrća uskladištenog pri temperaturi od 4°C u prisustvu različitih koncentracija omotača hitozana, uz upotrebu selektivnog PALCAM agara.
5. Određivanje ukupnog broja ispitivanih bakterijskih sojeva *L. monocytogenes*, u uzorcima sveže sečenog, minimalno prerađenog povrća uskladištenog pri temperaturi od 4°C u prisustvu kompozitnih filmova hitozana i želatina.
6. Ispitivanje antimikrobnih svojstava odabranih etarskih ulja koja su dodata u kompozitne filmove hitozana, na ukupan broj bakterija *L. monocytogenes* u odgovarajućem povrću.



7. Ispitivanje preživljavanja sojeva *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu, uz dodatak 0,25% i 0,5% hitozana, na temperaturi od 4°C.
8. Ispitivanje promena pH vrednosti i sadržaja suve materije u uzorcima povrća koji su skladišteni u prisustvu filmova sa različitim koncentracijama hitozana i evidentiranje eventualnih promena za svaku vrstu sečenog povrća.
9. Obavljanje senzorne analize u cilju ispitivanja mišljenja stručnog panela o prihvatljivosti minimalno prerađenog povrća koje je skladišteno u prisustvu filmova hitozana sa ili bez dodatka etarskih ulja mente i timijana.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Materijal

Program istraživanja obuhvata ispitivanje dva patogena soja *Listeria monocytogenes* 19112 i 19115 - serotip 4b, dobijenih iz američke kolekcije mikroorganizama ATCC (American Type Culture Collection).

Kulture su čuvane na kosom triptoznom soja agaru (HiMedia) sa dodatkom 0,6 % ekstrakta kvasca (TSAYE) na 4°C do dalje upotrebe.

U radu su korišćene sledeće mikrobiološke podloge:

Mueller Hinton agar (HiMedia),

Mueller Hinton bujon (HiMedia),

Trypton Soya Yeast Extract Agar (HiMedia),

Listeria Identification Agar Base (PALCAM) (HiMedia),

Listeria selectivni dodatak (PALCAM),

Fiziološki rastvor.

Sve podloge su pripremljene prema preporučenom uputstvu i sterilisane u autoklavu na 121°C u toku 15 minuta. Pripremljene podloge su do upotrebe čuvane na temperaturi od 4°C.

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja u radu su korišćena komercijalno dostupna etarska ulja timijana, mente, lovora, peršuna, bosiljka i karanfilića (Herba doo.).

Kao eksperimentalni material odabrano je povrće (kupus, šargarepa i crna rotkva), koje se najčešće konzumira u obliku svežih salata i koje je na domaćem tržištu prisutno kao minimalno prerađeno, sveže sečeno povrće.

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti hitozana korišćen je hitozan (Sigma Aldrich) srednje molekulske mase 190,000-310,000 Da i stepena deacetilovanja od 75-85%, u različitim koncentracijama. Hitozan je pripremljen rastvaranjem u 1% sirćetnoj ili 1% mlečnoj kiselini.

## 4.2. Metode ispitivanja

**Bakterijske kulture.** U istraživanju su korišćene dve patogene vrste bakterija, *L. monocytogenes* ATCC 19112 i *L. monocytogenes* ATCC 19115-serotip 4b, dobijene iz američke kolekcije mikroorganizama ATCC (American Type Culture Collection).

Kulture su čuvane na kosom triptoznom soja agaru (HiMedia) sa dodatkom 0,6 % ekstrakta kvasca (TSA YE) na 4°C do upotrebe. Pre svakog eksperimenta, bakterijske vrste su dva puta presejane na BHI agar (BHIA, HiMedia, Mumbai, India), i inkubirane na 37 °C, u toku 24h. Pet dobro izolovanih kolonija svake vrste, preneto je u 10 ml fiziološkog rastvora (0.85 % NaCl w/v) da bi se dobila radna suspenzija mikroorganizama sa približnom koncentracijom od  $10^8$  cfu/ml. Jedan mililitar ove suspenzije dodat je na svakih 100g pripremljenog povrća, dajući početnu koncentraciju mikroorganizama u povrću od približno  $10^4$  -  $10^5$  cfu/g.

**Priprema povrća.** Povrće je pripremljeno na odgovarajući način koji se koristi u industrijskim objektima za proizvodnju sveže sečenog, minimalno prerađenog povrća. Nakon pranja i ukljanjanja nejestivih delova, povrće je usitnjeno na rezanca.

Za ispitivanje uticaja samih povrtarskih vrsta koje se koriste kao salata na preživljavanje *L. monocytogenes*, pripremane su mešavine odgovarajućih vrsta povrća u odnosu 30:70; 50:50 i 70:30. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti hitozana u obliku omotača ili filmova, svaka vrsta povrća je ispitivana samostalno.

Pripremljeno povrće je izmereno u sterilnim staklenim sudovima, u količini od 200g. Nakon inokulacije sa pripremljenom suspenzijom odgovarajućeg bakterijskog soja, povrće je pod sterilnim uslovima dobro izmešano.

**Priprema omotača hitozana.** Hitozan srednje molekulske mase 190000-310000 Da i stepena deacetilovanja od 75-85% (Sigma-Aldrich, Germany) rastvoren je u 1% (v/v) rastvoru sirćetne kiseline ili 1 % (v/v) mlečne kiseline. Rastvor je mešan u toku 24 h, da bi se obezbedilo potpuno rastvaranje. Konačna koncentracija hitozana u rastvoru iznosila je 0,25%; 0,5% i 1%. Ovako pripremljeni rastvori hitozana, dodati su u povrće u obliku omotača.

**Priprema hitozan-želatin filmova.** Hitozan srednje molekulske mase 190000-310000 Da i stepena deacetilovanja od 75-85% (Sigma-Aldrich, Germany) korišćen je kao

matriks u koji je inkorporirano etarsko ulje timijana ili mente. Hitozan je rastvoren u 1% (v/v) vodenom rastvoru glacijalne sirćetne kiseline (Merck, Germany). Mešanje rastvora je vršeno u toku 24 h do potpunog rastvaranja. Konačna koncentracija hitozana u filmu iznosila je 0,5 % (w/v), 1 % (w/v) i 2% (w/v). Rastvor 6% (w/v) želatina (Centrohem, Serbia), pripremljen je sa 1 % (v/v) rastvorom sirćetne kiseline, upotrebom sledeće procedure: želatin je prvo hidriran 30 min na sobnoj temperaturi, a zatim je rastvoren na 45 °C (vodeno kupatilo), uz mehaničko mešanje do potpunog rastvaranja (približno 20 minuta). Pripremljeni rastvori želatina i hitozana su izmešani u odnosu 1:1 u cilju dobijanja homogene mase koja se koristila za izradu kompozitnog filma hitozan-želatina. Kao referentni uzorak, pripremljen je film od 6% želatina na isti način, bez dodaka hitozana. Približno 25 ml rastvora hitozan-želatina je pripremljeno za svaku Petri šolju. Jedna polovina pripremljenog rastvora je izlivena u poklopac, a druga polovina na dno Petri šolje. Nakon toga, kompozitni film je pod sterilnim uslovima ostavljen da se ohladi i očvrstne. Do upotrebe, pripremljeni filmovi su skladišteni na 4 °C.

Ista procedura je primenjena da bi se pripremili hitozan-želatin filmovi sa dodatkom etarskog ulja mente ili timijana (Herba doo., Serbia), koji su dodati u rastvor hitozan-želatina a zatim je vršeno mešanje u toku 5 min da bi se dobila homogena masa. Konačna koncentracija etarskih ulja u filmovima bila je 0,1% (w/v) i 0,2 % (w/v). Da bi se omogućilo emulgovanje etarskih ulja sa sastojcima filma, dimetil sulfoksid (Carlo Erba Reagents, France), je dodat u svaki kompozitni film u istim koncentracijama kao i ispitivana etarska ulja.

**Primena omotača hitozana.** Omotači hitozana su primenjeni na povrću upotrebom uvek iste procedure: 10 ml rastvora hitozana je dodato na 100g povrća. Tretman sa sirćetnom ili mlečnom kiselinom (bez hitozana) korišćen je da bi se procenio uticaj same kiseline koja je upotrebljena za pripremu omotača. Odgovarajuće kiseline su primenjene u uzorcima povrća na isti način kao i omotači hitozana. Uzorci su dobro izmešani i pod sterilnim uslovima inokulisani dodatkom pripremljene suspenzije mikroorganizama. Na svakih 100 g povrća, dodato je 1ml inokuluma. Približna koncentracija bakterija u uzorcima povrća bila je od  $10^4 - 10^5$  cfu  $g^{-1}$ . Inokulisano povrće bez bilo kakvog tretmana, služilo je

kao kontrola. Svi uzorci su skladišteni u sterilnim staklenim sudovima, na 4 °C. Mikrobiološka analiza uzoraka je vršena na svakih 24h, u toku 7 dana.

**Primena filmova hitozana.** Filmovi su primenjeni na svežem sečenom povrću (40 g) upotrebom sledeće procedure: uzorci povrća su inokulisani bakterijskim suspenzijama tako da je postignuta finalna koncentracija bakterija od  $10^4 - 10^5$  cfu g<sup>-1</sup>. Inokulisano povrće je upakovano između dva sloja kompozitnog filma hitozana u Petri šoljama. Tako pripremljeno povrće je skladišteno u plastičnim vrećicama na 4 °C. Mikrobiološka analiza uzoraka je vršena na svakih 24h, u toku 7 dana.

**Mikrobiološka analiza povrća tokom skladištenja.** Ukupan broj bakterija određivan je u uzorcima povrća, tokom perioda skladištenja. Uzorci povrća podvrgnuti su mikrobiološkoj analizi na početku istraživanja (0 dan) i nakon 1, 2, 3, 4, 5, i 6 dana skladištenja. Pod sterilnim uslovima, 10g uzorka je homogenizovano sa 90 ml fiziološkog rastvora, tokom 10 minuta (laboratorijski šejker J. P. Selecta, model 3000974). Zatim je pripremljena odgovarajuća serija razređenja u fiziološkom rastvoru (0.85 % NaCl w/v). Jedan mililitar odgovarajućeg razređenja je izliven u Petri šolje a zatim je preko njega preliven rashlađen Palcam agar (Hi Media, Mumbai, India), sa dodatkom akriflavin hidrohlorida (5 mg/l), polimiksina B (10 mg/l) i ceftazidima (20 mg/l). Petri šolje su kružnim pokretima dobro promešane i nakon hlađenja, inkubirane 24h, na 37 °C.

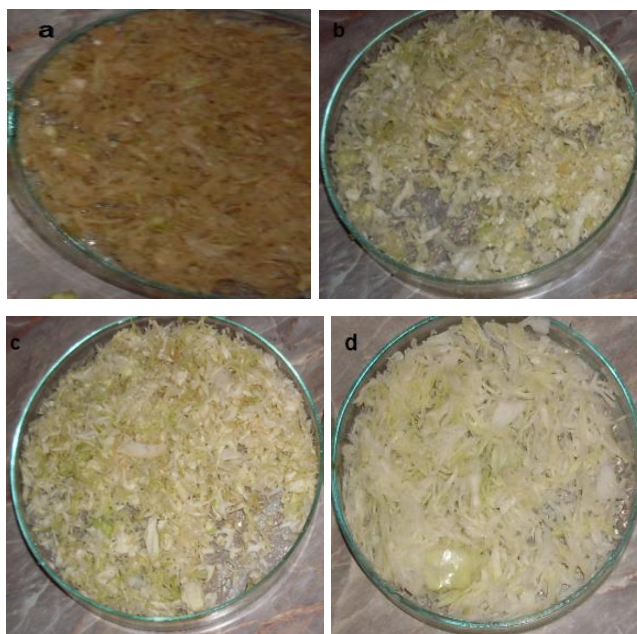
**Antimikrobna aktivnost etarskih ulja.** Za ispitivanje osetljivosti bakterijskih sojeva prema etarskim uljima korišćena je standardna disk difuziona metoda uz upotrebu Mueller-Hinton agara prema proceduri Instituta za kliničke i laboratorijske standarde [CLSI, 2006 a, b]. Kao kontrolni soj korišćena je *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ispitivane kulture mikroorganizama su pripremljene na Mueller - Hinton agaru (Hi Media, Mumbai, India). Pet karakterističnih kolonija je preneto u Mueller - Hinton bujon (Hi Media, Mumbai, India) a zatim je gustina podešena sterilnim fiziološkim rastvorom prema 0,5 McFarland standardu. Dobijena je suspenzija u fiziološkom rastvoru gustine  $10^6$  cfu/ml. U sterilne Petri ploče je izliveno po 25 ml sterilnog Mueller - Hinton agara. Površina agara je zatim inokulisana uz upotrebu sterilnog brisa (Bauer i Kirby, 1966). Pripremljena bakterijska suspenzija je dobro izmešana pomoću sterilnog brisa a višak tečnosti je uklonjen okretanjem brisa po unutrašnjoj strani epruvete iznad nivoa tečnosti.

Ovako pripremljenim brisom je inokulisana površina agara u tri različita pravca, rotirajući posudu za 60° posle svakog nanošenja. Po površini podloge zatim su raspoređeni sterilni papirni diskovi prečnika 6 mm (Bioanalyse). Svaki disk je natopljen sa po 10 $\mu$ l odgovarajućeg etarskog ulja. Da bi se zone inhibicije dobro videle, prostor između diskova ne sme biti manji od 24 mm, a rastojanje diska od ivice posude mora biti 1 cm. Nakon inkubacije na 37°C u toku 24h, su izmerene zone inhibicije oko diskova sa etarskim uljima i izračunata je srednja vrednost za tri različita merenja.

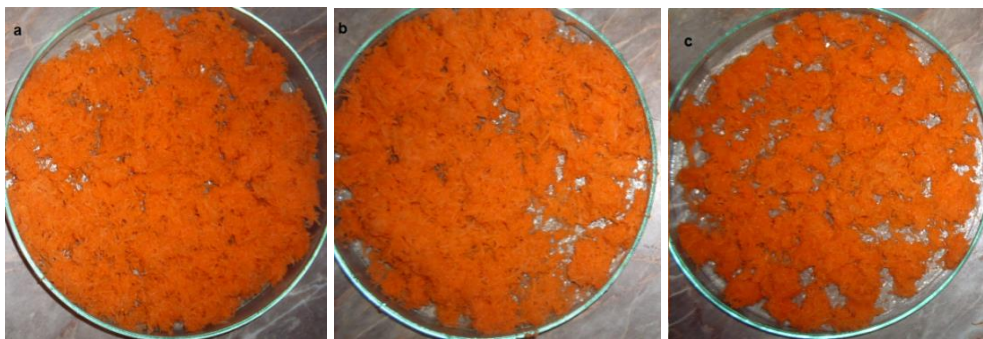
Antimikrobna aktivnost mešavina ispitana je na isti način, ali je u ovom slučaju na disk naneta mešavina različitih ulja u odnosu 1:1.

Efekat različitih kombinacija etarskih ulja na ispitivane sojeve *Listeria sp.* dobijen je računskim putem, pri čemu je za svaku mešavinu etarskog ulja izračunat procenat smanjenja ili povećanja zone inhibicije u odnosu na odgovarajuće etarsko ulje iz mešavine.

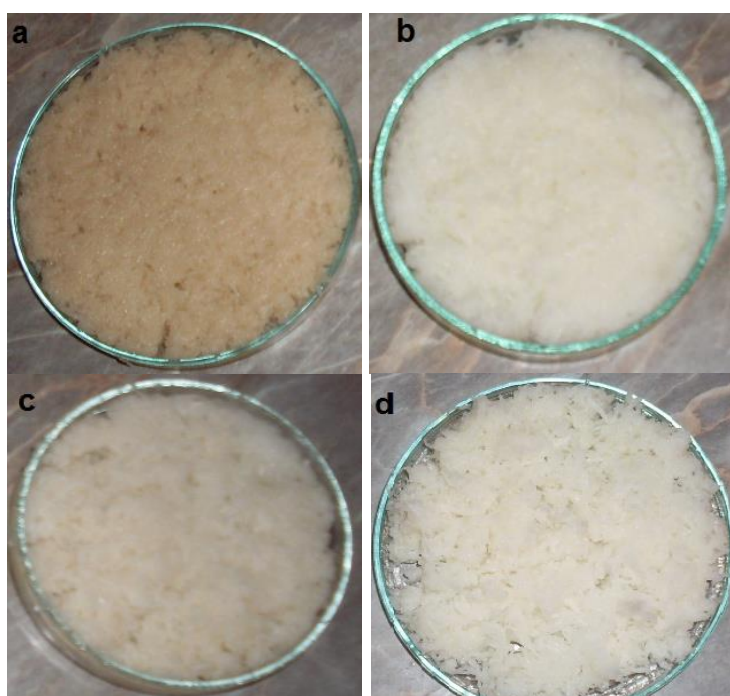


**Slika 8. Kupus nakon 96h skladištenja na temperaturi od 4°C**

(a-netretirani kupus; b-kupus u prisustvu 0,5% filma hitozana;  
c – kupus u prisustvu 1% filma hitozana i d-sveže sečeni kupus)



**Slika 9. Šargarepa nakon 96h skladištenja na temperaturi od 4°C**



**Slika 10. Rotkva nakon 96h skladištenja na temperaturi od 4°C**

(a-netretirana rotkva; b-rotkva u prisustvu 0,5% filma hitozana;  
c – rotkva u prisustvu 1% filma hitozana i d-sveže sečena rotkva)

**Ispitivanje sposobnosti rasta sojeva *Listeria monocytogenes* u majonezu u prisustvu hitozana.** U ovom delu rada korišćen je komercijalno dostupan majonez Polimark, kome je dodat hitozan u koncentraciji od 0,25 i 0,5%. Hitozan je prethodno pripremljen rastvaranjem u 1% rastvoru sirćetne kiseline. Inokulum je dodat u količini od 1 ml na 100 g majoneza.

Broj preživelih *Listeria* je određivan homogenizovanjem 10 g majoneza u 90ml 2% natrijum-citrata koji je zagrejan na vodenom kupatilu na 44°C. Jedan mililitar odgovarajućeg razređenja je izliven u Petri šolje a zatim je preko njega preliven rashlađen Palcam agar (Hi Media, Mumbai, India). Inkubacija je vršena 24 h na 37°C. Majonez bez dodatog hitozana korišćen je kao kontrola.

**Određivanje pH vrednosti.** pH vrednost uzoraka povrća skladištenih u prisustvu filmova hitozana određena je korišćenjem laboratorijskog pH metra (pH315i/set, Nemačka).

**Određivanje u vodi rastvorljive suve materije.** Suva materija rastvorljiva u vodi kod uzoraka povrća skladištenih u prisustvu filmova hitozana određena je upotrebom Abbe refraktometra, na temperaturi od 20°C.

**Senzorna analiza.** Senzornu analizu povrća obavila je petočlana grupa treniranih ocenjivača, različitih godina. Za ocenjivanje je korišćen bod sistem analitičkih deskriptivnih testova sa skalom od 1 do 9 (Faria i Yotsuyanagi, 2002), gde svaka ocena predstavlja određeni nivo kvaliteta. Tako, najniža ocena 1 predstavlja proizvode sa vidljivim nedostacima, koji su mnogo lošijeg kvaliteta od kontrole, ocena 5 je jednaka kontroli a ocena 9 predstavlja izuzetna senzorna svojstva, odnosno optimalan kvalitet proizvoda koji je bolji od kontrole.

Senzorna analiza povrća je obuhvatila ocenjivanje: svežine, boje, mirisa i ukusa povrća. Svako navedeno svojstvo je ocenjeno ocenom od 1 do 9, a ispitivanje je vršeno svakog dana tokom četiri dana skladištenja. Uzorci povrća su skladišteni u prisustvu filmova hitozana, na 4°C. Uzorci povrća (40g), pojedinačno su izošeni pred ocenjivače, u staklenim Petri posudama. Svaki uzorak je pojedinačno upakovan u PVC vrećice i obeležen odgovarajućim brojevima. Sveže sečeno povrće je služilo kao kontrola i pripremano je svakog dana ispitivanja. Prikazane su srednje vrednosti senzornih ocena za kvalitet ispitanih uzoraka povrća i izračunata je standardna devijacija.

**Statistička analiza.** Broj ćelija u uzorcima povrća određivan je tri puta i određena je srednja vrednost tri merenja, izražena u  $\log_{10}$  CFU/g. Rezultati su statistički testirani analizom varijanse (F-test) a srednja vrednost je poređena Studentovim t-testom na nivou značajnosti 0,05, uz upotrebu programa Microsoft Excel, 2007.



Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i njihovih mešavina određivan je prečnik zona inhibicija. Određena je srednja vrednost tri merenja, izražena u mm. Dobljene srednje vrednosti su poređene Studentovim t-testom na nivou značajnosti 0,05.

F test služi da bi se utvrdilo da li je razlika između varijansi dva uzorka značajna. Izračunata F-vrednost upoređena je sa kritičnom vrednošću; ukoliko je  $F_{izr} > F_{kr}$  nulta hipoteza se odbacuje, tj. razlika koja se javlja između standardnih devijacija ne može biti objašnjena samo uticajem slučajnih grešaka. U tom slučaju, kada je izračunata vrednost parametra F veća od kritične, nulta hipoteza se odbacuje, tj. standardne devijacije dva seta podataka su različite. Za upoređivanje srednjih vrednosti ova dva seta podataka, korišćen je t-test za standardne devijacije koje se statistički značajno razlikuju.

Ukoliko je  $F_{izr} < F_{kr}$ , nulta hipoteza se zadržava, tj. razlika koja se javlja između standardnih devijacija je posledica slučajnih grešaka. Kada je izračunata vrednost parametra F manja od kritične, nulta hipoteza se zadržava, tj. standardne devijacije dva seta podataka su bliske. Za upoređivanje srednjih vrednosti ova dva seta podataka, korišćen je t-test za bliske standardne devijacije.

Ukoliko je  $t_{izr} < t_{kr}$ , nulta hipoteza se prihvata ( $H_0 = 0$ ), odnosno između dva seta podataka ne postoji značajno velika razlika srednjih vrednosti. Ukoliko je  $t_{izr} > t_{kr}$ , nulta hipoteza se odbacuje ( $H_0 \neq 0$ ) odnosno, između dva seta podataka postoji značajno velika razlika srednjih vrednosti.

U cilju određivanja povezanosti između ispitivanih bakterijskih sojeva, izračunate su vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije (r). Testiranje značajnosti koeficijenta korelacije vršeno je na nivou značajnosti 0,05, upotrebom aproksimacije t-testa, za n-2 stepeni slobode, prema obrascu:

$$t = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Izračunate vrednost t- testa su poređene sa tabličnim vrednostima. Pri tom, za  $t_{izr} < t_{tab}$ , nulta hipoteza se prihvata ( $H_0 = 0$ ), odnosno koeficijent korelacije nije značajan. Ako je  $t_{izr} > t_{tab}$ , nulta hipoteza se odbacuje ( $H_0 \neq 0$ ) odnosno, koeficijent korelacije je značajan.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Antimikrobna aktivnosti etarskih ulja

Sva ispitivana etarska ulja pokazala su odgovarajuću antimikrobnu aktivnost. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja može biti izražena kao jaka, ako su ostvarene zone inhibicije veće od 20 mm, umerena aktivnost ako su ostvarene zone inhibicije između 12 i 20 mm i slaba aktivnost ako su zone inhibicije manje od 12 mm (Bendiabdellah *i sar.*, 2012). Rezultati dobijeni ispitivanjem antimikrobne aktivnosti etarskih ulja disk difuzionom metodom prikazani su u Tabeli 4.

**Tabela 4. Uticaj etarskih ulja na rast *L. monocytogenes* ATCC 19112 i *L. monocytogenes* ATCC 19115**

Etarsko ulje	<i>L.monocytogenes</i> ATCC 19112 Aritm.sred.± SD*	<i>L.monocytogenes</i> ATCC 19115 Aritm.sred.± SD*	<i>E.coli</i> ATCC 25922 Aritm.sred.± SD*
Timijan	49,0 ± 1,00	48,33 ± 0,58	37,67 ± 1,53
Lovor	14,33 ± 0,58	20,33 ± 2,52	22,66 ± 1,53
Menta	22,33 ± 0,58	27,33 ± 1,15	12,33 ± 0,58
Peršun	8,67 ± 0,58	8,67 ± 1,53	17,00 ± 1,00
Karanfilić	19,67 ± 0,58	17,67 ± 0,58	14,66 ± 1,15
Bosiljak	22,00 ± 1,00	27,66 ± 1,52	14,00 ± 1,00
Ruzmarin	20,66 ± 1,52	25,00 ± 1,00	12,33 ± 0,58

\*Vrednosti u tabeli su predstavljene u mm kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija

Iz prikazanih rezultata (Tabela 4), može se zapaziti da etarska ulja timijana, lovora, mente, bosiljka i ruzmarina pokazuju jaku antimikrobnu aktivnost prema soju *L. monocytogenes* ATCC 19115, dok etarsko ulje karanfilića ispoljava umerenu antimikrobnu aktivnost. Jaku antimikrobnu aktivnost prema soju *L. monocytogenes* ATCC 19112 ispoljila su etarska ulja timijana, mente, bosiljka i ruzmarina, dok etarska ulja karanfilića i lovora ispoljavaju umerenu antimikrobnu aktivnost. Etarsko ulje peršuna ispoljilo je slabu antilisterijsku aktivnost na oba ispitivana soja, sa ostvarenim zonama inhibicije od  $8,7 \pm 0,6$  za *L. monocytogenes* ATCC 19112 odnosno  $8,7 \pm 1,5$  za *L. monocytogenes* ATCC 19115.

Etarska ulja lovora, mente, bosiljka, ruzmarina, karanfilića i peršuna ispoljila su bakteriostatičnu aktivnost u koncentraciji od 10 µl / disku, dok etarsko ulje timijana ima

baktericidnu aktivnost. Na osnovu rezultata iz Tabele 4 se može zaključiti da je najsnažniju inhibitornu aktivnost pokazalo etarsko ulje timijana. Dobijene vrednosti za zone inhibicije kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 iznosile su 49 mm dok je kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 dobijena nešto manja vrednost od 48,3 mm. Iz dobijenih rezultata se može videti da između ispitivanih sojeva *L. monocytogenes* ne postoji statistički značajna razlika u osetljivosti prema etarskom ulju timijana.

Na osnovu rezultata koji su prikazani u Tabeli 4 može se videti da snažnu antimikrobnu aktivnost prema ispitivanim bakterijskim sojevima, ispoljava i etarsko ulje mente. U ovom slučaju soj *L. monocytogenes* ATCC 19115 ispoljio je veću osetljivost od soja *L. monocytogenes* ATCC 19112. Sa statističkom značajnošću  $p < 0,05$  može se tvrditi da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti ispitivanih sojeva prema etarskom ulju mente.

Etarsko ulje bosiljka kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 ostvarilo je inhibiciju od 22 mm dok je kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 inhibicija iznosila 27,7 mm. I u ovom slučaju se sa sigurnošću od 95 % može tvrditi da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti ispitivanih sojeva prema etarskom ulju bosiljka.

Na osnovu rezultata koji su prikazani u Tabeli 4 može se videti da je izraženu antimikrobnu aktivnost prema ispitivanim sojevima, ispoljilo i etarsko ulje ruzmarina. Ostvarena zona inhibicije za soj *L. monocytogenes* ATCC 19115 iznosila je 25 mm u poređenju sa sojem *L. monocytogenes* ATCC 19112 kod koga je postignuta inhibicija od 20,7 mm. Na osnovu dobijenih rezultata, sa sigurnošću od 95% se može tvrditi da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti ispitivanih sojeva prema etarskom ulju ruzmarina.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti etarskog ulja karanfilića ostvarene su zone inhibicije od 19,7 mm za soj *L. monocytogenes* ATCC 19112 odnosno 17,7 mm za soj *L. monocytogenes* ATCC 19115. Na osnovu dobijenih rezultata, može se sa sigurnošću od 95 % tvrditi da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti ispitivanih sojeva prema etarskom ulju karanfilića.

Najslabiji inhibicioni efekat postignut je sa etarskim uljem peršuna kod oba ispitivana bakterijska soja. Dobijene vrednosti zona inhibicije iznosile su 8,7 mm za oba

ispitivana soja što ukazuje da nema statistički značajne razlike između ispitivanih sojeva u osetljivosti prema etarskom ulju peršuna.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4. može se videti da skoro sve vrste ispitivanih etarskih ulja imaju efikasnije dejstvo na *L. monocytogenes* u odnosu na *E. coli*. Izuzetak je jedino etarsko ulje peršuna koje je pokazalo izraženiju inhibiciju *E. coli*.

Rezultati dobijeni ispitivanjem različitih mešavina etarskih ulja na rast sojeva *Listeria monocytogenes* prikazani su u Tabeli 5.

**Tabela 5. Uticaj mešavina različitih etarskih ulja na *L. monocytogenes* ATCC 19112 i *L. monocytogenes* ATCC 19115**

Mešavina etarskih ulja	<i>L.monocytogenes</i> ATCC 19112 Aritm.sred.± SD*	<i>L.monocytogenes</i> ATCC 19115 Aritm.sred.± SD*
Timijan-Lovor	27,67 ± 0,58	25,33 ± 1,15
Timijan-Ruzmarin	28,67 ± 0,58	31,67 ± 0,58
Timijan-Bosiljak	47,33 ± 2,08	33,67 ± 1,53
Timijan-Menta**	29,67 ± 0,58	31,00 ± 1,00
Timijan-Karanfilić	31,00 ± 1,00	28,33 ± 0,58
Ruzmarin-Lovor	13,33 ± 0,58	24,00 ± 1,00
Ruzmarin-Bosiljak**	13,00 ± 0,58	14,33 ± 0,58
Ruzmarin-Menta	18,33 ± 0,58	23,33 ± 0,58
Ruzmarin-Karanfilić**	18,67 ± 0,58	19,33 ± 1,53
Lovor-Bosiljak	13,67 ± 0,58	17,00 ± 1,00
Lovor-Menta	18,00 ± 1,00	25,67 ± 2,08
Lovor-Karanfilić**	13,33 ± 0,58	13,67 ± 0,58
Menta-Bosiljak	29,33 ± 1,53	24,67 ± 0,58
Menta-Karanfilić	19,33 ± 0,58	16,33 ± 0,58

\*Vrednosti u tabeli su predstavljene u mm kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

\*\*Mešavine etarskih ulja kod kojih ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih sojeva

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da sve mešavine etarskih ulja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost. Kod oba ispitivana soja *L. monocytogenes* najveća zona inhibicije ostvarena je sa mešavinom etarskih ulja timijana i bosiljka. Sa sigurnošću od 95% može se tvrditi da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti ispitivanih sojeva prema ovoj mešavini etarskih ulja. Osim toga, i ostale mešavine etarskih ulja sa timijanom, ispoljavaju značajnu inhibitornu aktivnost na oba ispitivana soja. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5 može se videti da je za mešavinu etarskih ulja timijana i ruzmarina

kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 zona inhibicije iznosila 31,7 mm, dok je kod soja ATCC 19112 ostvarena vrednost od 28,7 mm. Sa sigurnošću od 95% se može tvrditi da postoji statistički značajna razlika u osetljivosti ispitivanih sojeva prema kombinaciji etarskih ulja timijana i ruzmarina. Značajnu antimikrobnu aktivnost na rast soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 ispoljile su i mešavine etarskog ulja timijana i mente kao i timijana i karanfilića. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antimikrobne aktivnosti čistih etarskih ulja i njihovih mešavina može se zaključiti da dodatak etarskog ulja timijana značajno povećava antimikrobnu aktivnost drugih ispitivanih ulja. Međutim, ni jedna ispitivana kombinacija etarskih ulja nije doprinela povećanju antimikrobne aktivnosti etarskog ulja timijana. Kod soja *L. monocytogenes* ATCC19115 najveće zone inhibicije ostvarene su sa kombinacijom etarskih ulja: timijan – bosiljak, timijan - ruzmarin i timijan – menta.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5 može se uočiti da mešavina etarskih ulja mente i bosiljka takođe ispoljava značajnu antimikrobnu aktivnost. Kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 zona inhibicije ostvarena sa ovom mešavinom etarskih ulja iznosila je 29,3 mm dok je za soj *L. monocytogenes* ATCC 19115 dobijena vrednost od 24,7 mm. Između ispitivanih bakterijskih sojeva utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$  u osetljivosti prema ovoj mešavini etarskih ulja.

Poređenjem zona inhibicije koje su dobijene za različite mešavine etarskih ulja i zona inhibicije koje su ostvarene sa čistim etarskim uljima, mogu se dobiti odgovarajući procenti povećanja ili smanjenja zona inhibicije odgovarajućih mešavina etarskih ulja. Na osnovu izračunatih vrednosti može se odrediti efikasnost mešavina prema ispitivanim sojevima *Listeria sp.*, u odnosu na čista etarska ulja. Kod *L. monocytogenes* ATCC 19112, najveći procenat povećanja zona inhibicije je ostvaren kod mešavine timijan - bosiljak (115%), u odnosu na čisto etarsko ulje bosiljka. Za mešavinu timijan - lovor povećanje zone inhibicije u odnosu na etarsko ulje lovora iznosi 93,5%. Kod *L. monocytogenes* ATCC 19115, najveći procenat povećanja zona inhibicije postignut je sa mešavinom timijan-karanfilić i iznosio je 60,3%, u poređenju sa čistim etarskim uljem karanfilića. Za oba ispitivana bakterijska soja, zone inhibicija koje su ostvarene sa mešavinama ruzmarin -

bosiljak, ruzmarin - menta, lovor - bosiljak i lovor - karanfilić su manje od pojedinačnih vrednosti zona inhibicija čistih etarskih ulja.

## 5.2. Sposobnost rasta sojeva *L. monocytogenes* na povrću

### 5.2.1. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na kupusu i šargarepi

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom kupusu, šargarepi i njihovim različitim mešavinama dati su u Tabeli 6 (Grafik 1).

Na početku ispitivanja utvrđena je statistički značajna razlika između prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu i šargarepi, kao i između kupusa i svih mešavina sa šargarepom. Nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između uzoraka same šargarepe i mešavina pripremljenih od 50% kupusa i 50% šargarepe kao i mešavine od 30% kupusa i 70% šargarepe.

**Tabela 6. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u svežem kupusu, šargarepi i njihovim mešavinama ( $\log_{10}$  CFU/g)**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.97±0.03 <sup>a</sup>	5.26±0.09 <sup>a</sup>	5.50±0.04 <sup>a</sup>	6.10±0.1 <sup>a</sup>	6.50±0.04 <sup>a</sup>	6.70±0.02 <sup>a</sup>
Šargarepa	3.70±0.09 <sup>b,c</sup>	4.00±0.05 <sup>b</sup>	3.08±0.11 <sup>b</sup>	2.36±0.32 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
50% kupusa i 50% šargarepe	4.10±0.18 <sup>c,d</sup>	4.40±0.03 <sup>c</sup>	3.78±0.18 <sup>b,c</sup>	3.28±0.07 <sup>c</sup>	3.10±0.06 <sup>b</sup>	2.90±0.15 <sup>b</sup>	2.50±0.07 <sup>b</sup>
30% kupusa i 70% šargarepe	3.80±0.15 <sup>b,c,d</sup>	4.10±0.11 <sup>b,d</sup>	3.15±0.13 <sup>b,c,d</sup>	2.40±0.17 <sup>b,d</sup>	ND	ND	ND
70% kupusa i 30% šargarepe	4.60±0.04 <sup>e</sup>	4.70±0.04 <sup>e</sup>	4.60±0.03 <sup>e</sup>	4.98±0.01 <sup>e</sup>	5.48±0.02 <sup>c</sup>	4.70±0.03 <sup>c</sup>	4.40±0.04 <sup>c</sup>

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

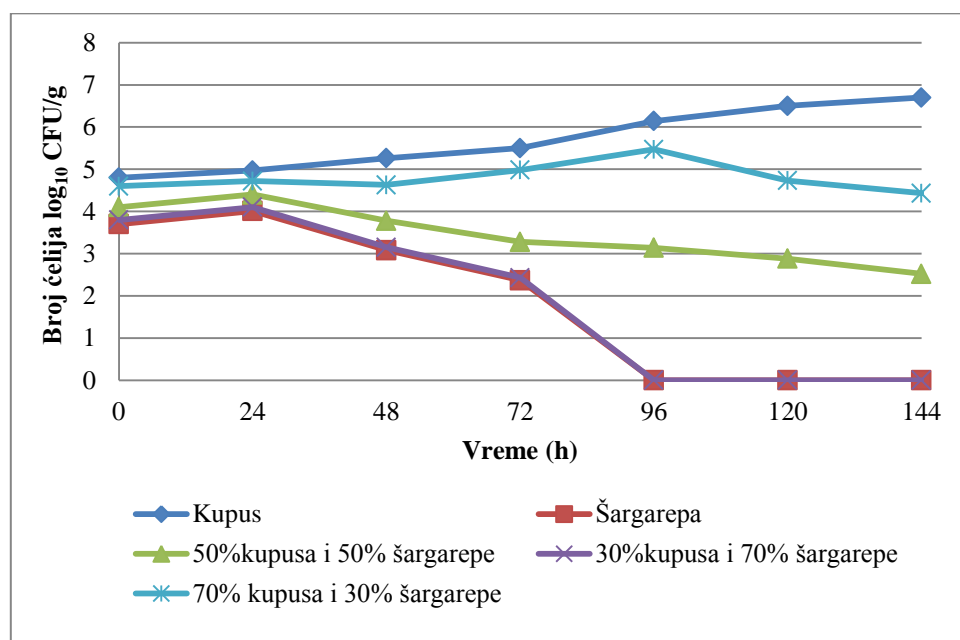
Prosečan ukupan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu, nakon 24h skladištenja, bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog ukupnog broja bakterija u svim mešavinama kupusa i šargarepe. Za prvih 24h skladištenja povrća, nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnog broja bakterija u šargarepi i mešavini od 30% kupusa i 70% šargarepe.

Nakon dva dana skladištenja (48h) između prosečnih vrednosti za broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu, šargarepi kao i svim mešavinama povrća utvrđena

je statistički značajna razlika. Između uzoraka šargarepe i mešavina sa 30% kupusa i 70% šargarepe i 50% kupusa i 50% šargarepe, nije utvrđena statistički značajna razlika.

Nakon trećeg dana skladištenja (72h) utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između prosečnog broja bakterija kod svih poređenih uzoraka osim za uzorke šargarepe i uzorke pripremljene od 30% kupusa i 70% šargarepe kod kojih nije utvrđena statistički značajna razlika. Za narednih 96h odnosno 120h utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$  za sve poređene uzorke povrća.

Iz rezultata prikazanih na Grafiku 1. može se uočiti da sveže sečeni kupus predstavlja dobar supstrat za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115. Početni broj ovih bakterija za vreme od 144h skladištenja uvećao se za  $1,9 \log_{10}$  CFU/g. Za razliku od kupusa, sveže sečena šargarepa ispoljava inhibitorni efekat koji se manifestuje smanjenjem početnog broja *Listeria sp.*, pri čemu se nakon 4. dana skladištenja, na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ , više nije moglo detektovati prisustvo ovih bakterija u uzorcima šargarepe.



**Grafik 1. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenom kupusu, šargarepi i njihovim različitim mešavinama**

Upotrebljena mešavina povrća koja se sastoji od 70% kupusa i 30% šargarepe u poređenju sa samim kupusom omogućila je smanjenje bakterijske populacije od  $2,3 \log_{10}$

CFU/g u toku 144h skladištenja na temperaturi od 4°C. Na nivou značajnosti 0,05, sa sigurnošću od 95% može se tvrditi da je ostvarena razlika statistički značajna. Kod mešavine povrća koja se sastojala od 50% kupusa i 50% šargarepe, za isti period skladištenja, uočeno je smanjenje bakterijske populacije od 4,2 log<sub>10</sub> CFU/g, u poređenju sa samim kupusom koji je služio kao kontrolni uzorak. Kod ove kombinacije sveže sečenog povrća može se već nakon 48h skladištenja uočiti smanjenje od 1,5 log<sub>10</sub> CFU/g u poređenju sa čistim kupusom. Ovakav opadajući trend bakterijske populacije uočava se sve do kraja ispitivanja. Smanjenje brojnosti populacije ispitivanog soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 veće od 5 log<sub>10</sub> CFU/g u poređenju sa samim kupusom, uočava se kod uzorka koji se sastoji od 30% kupusa i 70% šargarepe za period od 96h. Na nivou značajnosti 0,05 i sa sigurnošću od 95%, može se tvrditi da postoji statistički značajna razlika u brojnosti populacije ispitivanog bakterijskog soja, kod svih mešavina kupusa i šargarepe u poređenju sa kupusom (kontrola). Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 1), može se zapaziti da dodatak šargarepe u koncentraciji od 50% u kupus, značajno smanjuje prosečan broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u ovom povrću. Vrednosti korelacionog koeficijenta ( $r = -0,96$ ) ukazuju da između ispitivanih uzoraka kupusa i mešavine sa 50% kupusa i 50% šargarepe postoji jaka negativna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije utvrđeno je da na ponašanje soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 značajno utiče dodatak 50% šargarepe, u poređenju sa samim kupusom. Između uzoraka kupusa i mešavine koja se sastoji od 30% kupusa i 70% šargarepe utvrđena je jaka negativna zavisnost ( $r = -0,94$ ). Ovi uzorci se značajno razlikuju na nivou značajnosti 0,05. Dodatak šargarepe kupusu, u koncentraciji od 30%, nije značajno uticao na smanjenje prosečnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu.

Određivanjem vrednosti korelacionog koeficijenta ( $r = -0,94$ ) za rast ispitivanog soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 na kupusu i šargarepi utvrđena je jaka negativna korelacija na nivou značajnosti 0,05.

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 1), može se uočiti da dodatak kupusa šargarepi, u koncentraciji od 30% ne utiče značajno na inhibitornu aktivnost same šargarepe. Kod uzoraka čiste šargarepe i mešavine koja se sastoji od 30% kupusa i 70% šargarepe već nakon četiri dana skladištenja nije se moglo detektovati prisustvo *L.*



*monocytogenes* ATCC 19115. Vrednost korelacionog koeficijenta za ove uzorke ( $r = 0.99$ ), pokazuje da između njih postoji jaka pozitivna zavisnost. Utvrđena razlika u ponašanju soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 na šargarepi i mešavini koja se sastoji od 30% kupusa i 70% šargarepe, je statistički značajna, na nivou značajnosti 0,05.

Između uzoraka šargarepe i mešavine koja se sastoji od 70% kupusa i 30% šargarepe utvrđena je slaba pozitivna povezanost ( $r = 0.08$ ).

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu i šargarepi i njihovim različitim mešavinama prikazani su u Tabeli 7 (Grafik 2).

**Tabela 7. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u svežem kupusu, šargarepi i njihovim mešavinama ( $\log_{10}$  CFU/g)**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	5.30±0.09 <sup>a</sup>	5.60±0.04 <sup>a</sup>	5.90±0.02 <sup>a</sup>	6.30±0.07 <sup>a</sup>	7.10±0.07 <sup>a</sup>	8.10±0.04 <sup>a</sup>	8.40±0.09 <sup>a</sup>
Šargarepa	3.70±0.10 <sup>b</sup>	3.60±0.08 <sup>b</sup>	3.70±0.13 <sup>b</sup>	3.90±0.05 <sup>b</sup>	3.40±0.09 <sup>b</sup>	2.17±0.11 <sup>b</sup>	1.30±0.24 <sup>b</sup>
50% kupusa i 50% šargarepe	5.00±0.11 <sup>c</sup>	5.30±0.05 <sup>c</sup>	5.40±0.09 <sup>c</sup>	5.80±0.10 <sup>c</sup>	5.50±0.08 <sup>c</sup>	5.50±0.04 <sup>c</sup>	5.37±0.04 <sup>c</sup>
30% kupusa i 70% šargarepe	4.10±0.08 <sup>d</sup>	4.40±0.06 <sup>d</sup>	4.40±0.09 <sup>d</sup>	4.90±0.15 <sup>d</sup>	4.80±0.21 <sup>d</sup>	4.60±0.06 <sup>d</sup>	4.30±0.13 <sup>d</sup>
70% kupusa sa 30% šargarepe	5.10±0.06 <sup>c,e</sup>	5.40±0.08 <sup>c,e</sup>	5.70±0.06 <sup>e</sup>	6.05±0.07 <sup>e</sup>	6.50±0.01 <sup>e</sup>	6.30±0.05 <sup>e</sup>	6.40±0.08 <sup>e</sup>

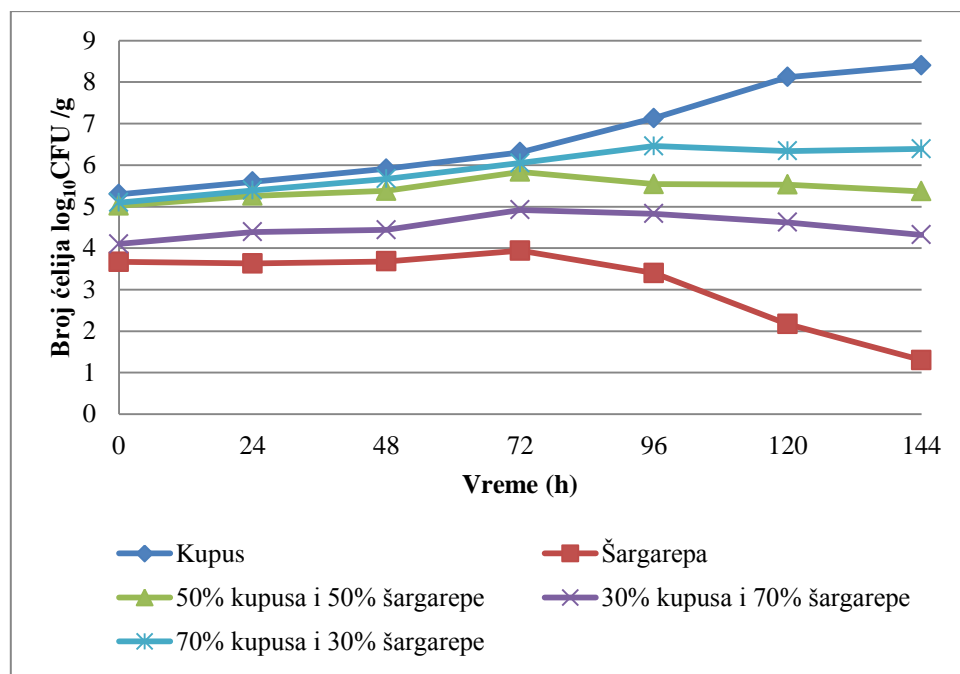
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Na početku ispitivanja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između prosečnog ukupnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima kupusa i šargarepe, kao i između svih pripremljenih mešavina povrća (uzorci sa 30% kupusa i 70% šargarepe, 50% kupusa sa 50% šargarepe, i 70% kupusa sa 30% šargarepe). Između prosečnog ukupnog broja bakterija u uzorcima koji su pripremljeni sa 50% kupusa i 50% šargarepe kao i 70% kupusa sa 30% šargarepe nije utvrđena statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ . Prosečan ukupan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u kupusu, na početku ispitivanja, bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog ukupnog broja bakterija u šargarepi, kao i u svim ispitivanim mešavinama kupusa i šargarepe. Između svih ispitivanih uzoraka povrća, utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ , nakon prvog dana skladištenja.

Nakon drugog dana skladištenja (48h) utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ , između svih ispitivanih uzoraka. Ovakav trend zadržan je do kraja ispitivanja.

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da sveže sečeni kupus pruža veoma povoljne uslove za rast i razviće *L. monocytogenes* ATCC 19112, čiji se početni broj nakon šest dana skladištenja na temperaturi od 4°C povećao za 3,1  $\log_{10}$  CFU/g. Sveže sečena šargarepa ispoljava antilisterijski efekat na rast soja *L. monocytogenes* ATCC 19112, što je registrovano smanjenjem početnog broja bakterija nakon četvrtog dana skladištenja na temperaturi od 4°C.

Između uzoraka šargarepe i kupusa, za soj *L. monocytogenes* ATCC 19112, utvrđena je jaka negativna povezanost ( $r = -0,88$ ), pri čemu se uzorci statistički značajno razlikuju na nivou značajnosti 0,05.



**Grafik 2. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu, šargarepi i njihovim različitim mešavinama**

Upotrebljena mešavina povrća koja se sastoji od 50% kupusa i 50% šargarepe ispoljila je takođe inhibitorski efekat na rast soja *L. monocytogenes* ATCC 19112. Ova kombinacija svežeg povrća, nakon 96h skladištenja, ostvarila je smanjenje veće od 1,5  $\log_{10}$

CFU/g u poređenju sa čistim kupusom. Ukupno smanjenje brojnosti populacije za period od 6 dana iznosilo je  $3 \log_{10}$  CFU/g, u poređenju sa uzorkom samog kupusa. Na nivou značajnosti 0,05, može se tvrditi da je ostvarena razlika statistički značajna.

Kod mešavine povrća koja je pripremljena od 30% kupusa i 70% šargarepe uočeno je smanjenje broja bakterija od  $1,5 \log_{10}$  CFU/g u poređenju sa čistim kupusom već nakon 48h skladištenja (Grafik 2). Ukupno smanjenje ispitivane bakterijske populacije, za kombinaciju povrća koja se sastojala od 30% kupusa i 70% šargarepe, u vremenu od 144h iznosilo je  $4,1 \log_{10}$  CFU/g u poređenju sa uzorkom kupusa. Na osnovu statističke analize, može se tvrditi da postoji statistički značajna razlika u brojnosti populacije ispitivanog soja bakterija u uzorcima šargarepe i svim upotrebljenim kombinacijama povrća. Kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 ni jedna od upotrebljenih mešavina kupusa i šargarepe nije u potpunosti inhibirala rast ovih bakterija.

Vrednost korelacionog koeficijenta ( $r = 0.99$ ), za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na kupusu, ukazuje da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

Vrednost korelacionog koeficijenta ( $r = 0.68$ ), za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na šargarepi, ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji srednja pozitivna zavisnost, pri konstantnoj temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

### **5.2.2. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na šargarepi i rotkvi**

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj rotkvi i šargarepi i njihovim različitim mešavinama prikazani su u Tabeli 8 (Grafik 3).

Na početku ispitivanja, nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnog ukupnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u crnoj rotkvi i svim uzorcima sa dodatom

šargarepom. Prosečan broj bakterija u šargarepi, bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog ukupnog broja bakterija u svim ispitivanim mešavinama povrća. Ukupan broj ispitivane bakterijske vrste u uzorcima crne rotkve smanjivao se počevši od nultog dana do četvrtog dana (96h), kada se više nije mogao detektovati u uzorcima ovog povrća.

**Tabela 8. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u svežoj šargarepi, crnoj rotkvi i njihovim mešavinama ( $\log_{10}$  CFU/g)**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Crna rotkva	5.00±0.05 <sup>a</sup>	4.40±0.04 <sup>a</sup>	4.00±0.05 <sup>a</sup>	2.90±0.01 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
Šargarepa	5.20±0.02 <sup>b</sup>	5.65±0.04 <sup>b</sup>	5.82±0.03 <sup>b</sup>	5.20±0.06 <sup>b</sup>	3.30±0.04 <sup>b</sup>	2.20±0.07 <sup>b</sup>	1.30±0.24 <sup>b</sup>
50% rotkve i 50% šargarepe	5.00±0.03 <sup>a,c</sup>	5.00±0.06 <sup>c</sup>	4.80±0.03 <sup>c</sup>	4.40±0.04 <sup>c</sup>	2.80±0.03 <sup>c</sup>	1.40±0.10 <sup>c</sup>	ND
30% rotkve i 70% šargarepe	5.00±0.06 <sup>a</sup>	4.90±0.04 <sup>d</sup>	4.80±0.07 <sup>c,d</sup>	4.50±0.05 <sup>d</sup>	3.00±0.05 <sup>d</sup>	1.60±0.11 <sup>d</sup>	ND
70% rotkve i 30% šargarepe	4.90 ±0.03 <sup>a,d</sup>	4.13±0.14 <sup>e</sup>	4.14±0.05 <sup>e</sup>	3.90±0.02 <sup>e</sup>	2.20±0.08 <sup>e</sup>	0.80±0.70 <sup>e</sup>	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ),

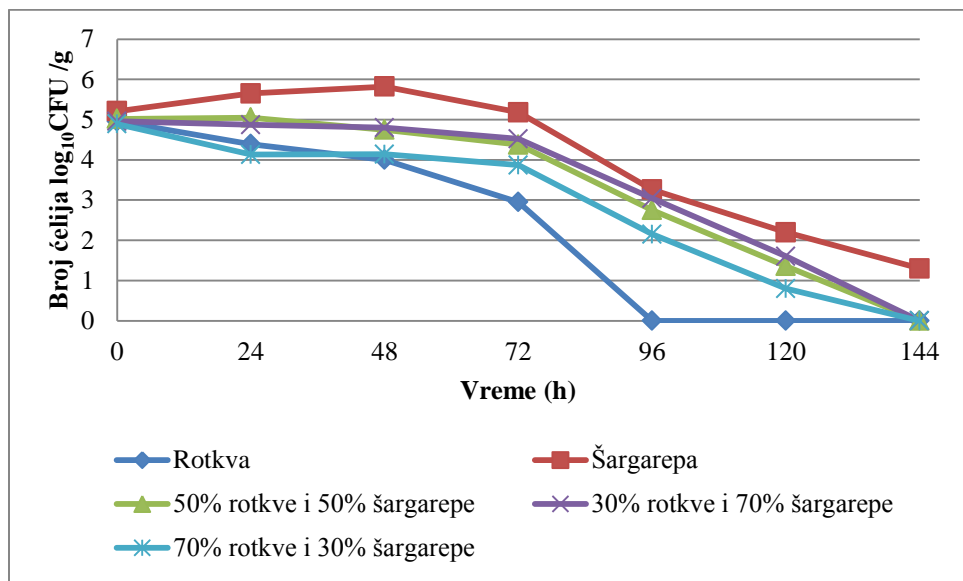
ND – ne može se detektovati.

Između prosečnog ukupnog broja bakterija kod svih uzoraka povrća utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ , nakon 24h skladištenja.

Između prosečnog ukupan broj ispitivane bakterijske vrste za sve uzorke povrća osim mešavine pripremljene sa 30% rotkve i 70% šargarepe i mešavine sa 50% rotkve i 50% šargarepe, utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ , nakon 48h skladištenja.

Za vremenski period skladištenja od 72h, odnosno 96h utvrđena je statistički značajna razlika između svih ispitivanih uzoraka povrća. Nakon 144h skladištenja ostvarena je potpuna inhibicija ispitivane bakterijske vrste u svim uzorcima povrća koji su pripremljeni sa crnom rotkvom.

Iz rezultata prikazanih na Grafiku 3. može se zaključiti da sveže sečena crna rotkva pokazuje snažniju antimikrobnu aktivnost od šargarepe. U toku prvih 48h skladištenja, crna rotkva izaziva smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 približno oko 1  $\log_{10}$  CFU/g, dok je potpuna inhibicija ispitivanog soja ostvarena nakon 96h. Smanjenje prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorku crne rotkve iznosilo je 2,3  $\log_{10}$  CFU/g, za period od 72h, u poređenju sa uzorkom šargarepe. Na nivou značajnosti 0,05, može se tvrditi da je ostvarena razlika statistički značajna.



**Grafik 3. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj rotkvi, šargarepi i njihovim različitim mešavinama**

Iz rezultata prikazanih na Grafiku 3, može se zapaziti da sve upotrebljene mešavine rotkve i šargarepe takođe pokazuju inhibitorni efekat na razviće ovog soja bakterija. Najizraženiju antimikrobnu aktivnost ispoljila je mešavina povrća koja se sastoji od 70% rotkve i 30% šargarepe kod koje se već u toku prvih 24 h skladištenja, postiže smanjenje brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 1,5 log<sub>10</sub> CFU/g u poređenju sa uzorkom same šargarepe. Smeša povrća pripremljena od 50% crne rotkve i 50% šargarepe, na temperaturi od 4°C, za vreme od 120h (5 dana) izazvala je smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 3,6 log<sub>10</sub> CFU/g, u poređenju sa smanjenjem od 3 log<sub>10</sub> CFU/g koje je zabeleženo u uzorcima same šargarepe. Sa sigurnošću od 95%, može se tvrditi da dodatak rotkve u šargarepu u koncentraciji od 50% značajno doprinosi smanjenju ovog bakterijskog soja, u poređenju sa samom šargarepom. Smeša povrća pripremljena od 30% crne rotkve i 70% šargarepe, na temperaturi od 4°C, za vreme od 120 h (5 dana) izazvala je smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 3,3 log<sub>10</sub> CFU/g, u poređenju sa smanjenjem od 3 log<sub>10</sub> CFU/g koje je zabeleženo u uzorcima same šargarepe. Može se videti da dodatak rotkve šargarepi u koncentraciji od 30% značajno doprinosi smanjenju ovog bakterijskog soja (p<0,05), u poređenju sa samom šargarepom.

Kod svih upotrebljenih mešavine rotkve i šargarepe ostvarena je potpuna inhibicija ispitivanog bakterijskog soja nakon 144h skladištenja na 4°C.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj šargarepi i crnoj rotkvi i njihovim različitim mešavinama prikazani su u Tabeli 9 (Grafik 4).

Na početku ispitivanja, utvrđena je statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$  između prosečnog ukupnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u rotkvi i šargarepi i svim ispitivanim uzorcima povrća. Ukupan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 je opadao počevši od nultog dana do 120h (5. dan) kada se više nije mogao detektovati u uzorcima crne rotkve. Nakon prvih 24h skladištenja, nije utvrđena statistički značajna razlika, između prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima pripremljenim sa 30% rotkve i 70% šargarepe i uzorcima pripremljenim sa 50% rotkve i 50% šargarepe.

**Tabela 9. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u svežoj šargarepi, crnoj rotkvi i njihovim mešavinama ( $\log_{10}$  CFU/g)**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Crna rotkva	4.60±0.06 <sup>a</sup>	3.87±0.09 <sup>a</sup>	3.30±0.10 <sup>a</sup>	2.90±0.10 <sup>a</sup>	1.70±0.19 <sup>a</sup>	ND	ND
Šargarepa	4.90±0.09 <sup>b</sup>	5.02±0.13 <sup>b</sup>	5.13±0.06 <sup>b</sup>	5.30±0.07 <sup>b</sup>	4.90±0.06 <sup>b</sup>	3.68±0.09 <sup>b</sup>	2.80±0.07 <sup>b</sup>
50% rotkve i 50% šargarepe	4.70±0.04 <sup>c,b</sup>	4.30±0.12 <sup>c</sup>	4.05±0.06 <sup>c</sup>	3.80±0.08 <sup>c</sup>	3.48±0.08 <sup>c</sup>	2.06±0.10 <sup>c</sup>	ND
30% rotkve i 70% šargarepe	4.80±0.08 <sup>a,b,d</sup>	4.40±0.08 <sup>c,d</sup>	4.35±0.07 <sup>d</sup>	4.27±0.06 <sup>d</sup>	3.60±0.11 <sup>c,d</sup>	2.27±0.08 <sup>d</sup>	ND
70% rotkve i 30% šargarepe	4.50±0.05 <sup>a,e</sup>	4.10±0.13 <sup>a,c,e</sup>	3.40±0.08 <sup>a,e</sup>	2.90±0.05 <sup>a,e</sup>	1.90±0.11 <sup>a,e</sup>	ND	ND

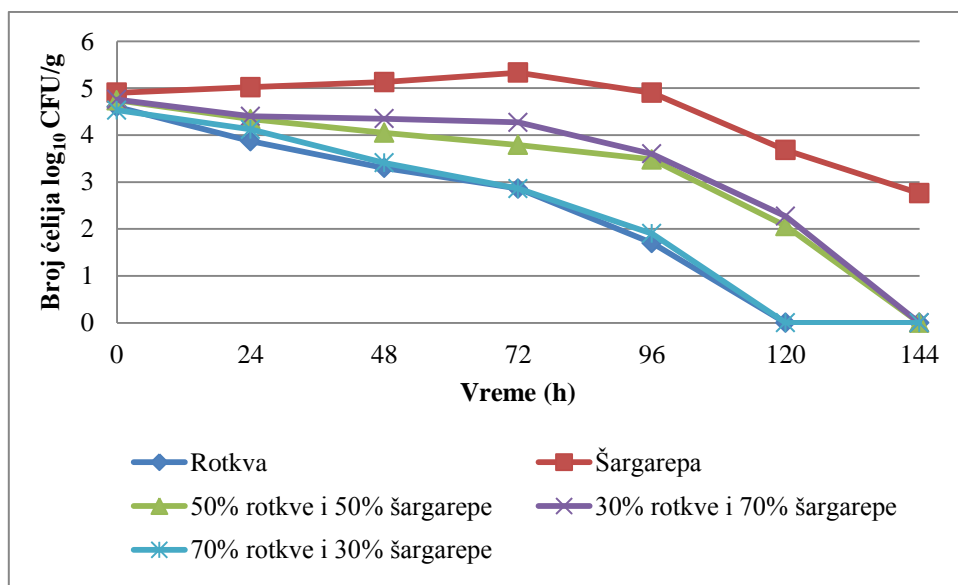
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ), ND – ne može se detektovati.

Nakon 48h skladištenja, utvrđena je statistički značajna razlika prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 između svih uzoraka povrća.

Sposobnost rasta soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj šargarepi, crnoj rotkvi i njihovim različitim mešavinama prikazana je na Grafik 4. Iz prikazanih rezultata može se videti da je šargarepa povoljniji supstrat za razvoj ovog bakterijskog soja, u poređenju sa crnom rotkvom. Razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 između šargarepe i crne rotkve za prvih 24h skladištenja iznosila 1,3  $\log_{10}$  CFU/g, odnosno 1,8  $\log_{10}$  CFU/g za 48h. Na nivou značajnosti 0,05 može se tvrditi da je utvrđena

razlika statistički značajna. Naj snažniju inhibitornu aktivnost ispoljava čista rotkva. Za period od 24h, 48h i 72h početni broj ispitivanog soja bakterija smanjio se za 0,7 log<sub>10</sub> CFU/g, 1,3 log<sub>10</sub> CFU/g odnosno 1,7 log<sub>10</sub> CFU/g u uzorcima crne rotkve. Potpuna inhibicija ispitivanog soja postignuta je sa rotkvom za 120h. Sličnu aktivnost ispoljila je i mešavina povrća pripremljena od 70% rotkve i 30% šargarepe.

Smeša povrća pripremljena od 50% crne rotkve i 50% šargarepe, na temperaturi od 4°C, za vreme od 120h (5 dana) izazvala je smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 2,6 log<sub>10</sub> CFU/g, u poređenju sa smanjenjem od 1,2 log<sub>10</sub> CFU/g koje je zabeleženo u uzorcima same šargarepe. Sa sigurnošću 95%, može se tvrditi da dodatak rotkve šargarepi u koncentraciji od 50% može značajno da doprinese smanjenju ovog bakterijskog soja, u poređenju sa samom šargarepom.



**Grafik 4. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj rotkvi, šargarepi i njihovim različitim mešavinama**

Smeša povrća pripremljena od 30% crne rotkve i 70% šargarepe, na temperaturi od 4°C, za vreme od 120h (5 dana) izazvala je smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 2,5 log<sub>10</sub> CFU/g, u poređenju sa smanjenjem od 1,2 log<sub>10</sub> CFU/g koje je zabeleženo u uzorcima same šargarepe. Sa sigurnošću od 95% se može tvrditi da dodatak rotkve u šargarepu, u koncentraciji od 30%, značajno doprinosi smanjenju ovog

bakterijskog soja. Kod mešavine povrća koja je pripremljena sa 30% odnosno 50% crne rotkve, potpuna inhibicija *L. monocytogenes* ATCC 19112 je postignuta nakon 144h skladištenja.

Vrednost korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na rotkvi ( $r = 0.95$ ), ukazuje da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

### 5.3. Sposobnost rasta sojeva *L. monocytogenes* na povrću u prisustvu omotača hitozana

#### 5.3.1. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na rotkvi u prisustvu omotača hitozana

Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj crnoj rotkvi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1% prikazani su u Tabeli 10 (Grafik 5).

**Tabela 10. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj crnoj rotkvi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1%**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Crna rotkva	4.60±0.10 <sup>a</sup>	4.00±0.11 <sup>a</sup>	3.50±0.07 <sup>a</sup>	2.70±0.09 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
1% sirćetna kiselina	4.60±0.08 <sup>a,b,c</sup>	2.73±0.04 <sup>b</sup>	1.50±0.15 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
1% mlečna kiselina	4.60±0.05 <sup>a,b,c</sup>	3.10±0.13 <sup>c,b</sup>	2.30±0.12 <sup>c</sup>	0.80±0.70 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
0,25% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.60±0.03 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,25% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.70±0.02 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.00±0.11 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.20±0.07 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1% hitozan sa sirćetnom kiselinom	1.50±0.15 <sup>h</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1% hitozan sa mlečnom kiselinom	1.70±0.09 <sup>h,i</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.



Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115, u uzorcima koji su tretirani 1% hitozanom pripremljenim sa sirćetnom kiselinom bio je statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u kontrolnom uzorku u nultom trenutku ispitivanja, i iznosio je  $3,1 \log_{10}$  CFU/g. Razlika u prosečnom broju ispitivanih bakterija između kontrolnog uzorka rotkve i uzorka koji je tretiran 1% hitozanom pripremljenim sa mlečnom kiselinom iznosila je  $2,9 \log_{10}$  CFU/g na početku ispitivanja. Ova razlika je statistički značajna na nivou  $p < 0,05$ .

Za uzorke koji su tretirani 0,5% hitozanom, smanjenje prosečnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 je u poređenju sa kontrolom iznosilo  $2,6 \log_{10}$  CFU/g za omotače pripremljene sa sirćetnom kiselinom, odnosno  $2,4 \log_{10}$  CFU/g za omotače pripremljene sa mlečnom kiselinom. Prosečan broj bakterija u kontrolnom uzorku crne rotkve i u uzorcima tretiranim 0,5% hitozanom statistički se značajno razlikovao na nivou značajnosti  $p < 0,05$ , na početku ispitivanja.

Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115, u uzorcima koji su tretirani 0,25% hitozanom pripremljenim sa sirćetnom kiselinom bio je statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u kontrolnom uzorku na početku ispitivanja, i iznosio je  $2 \log_{10}$  CFU/g. Razlika u prosečnom broju ispitivanih bakterija između kontrolnog uzorka rotkve i uzorka koji je tretiran 0,25% hitozanom pripremljenim sa mlečnom kiselinom iznosila je  $1,9 \log_{10}$  CFU/g na početku ispitivanja.

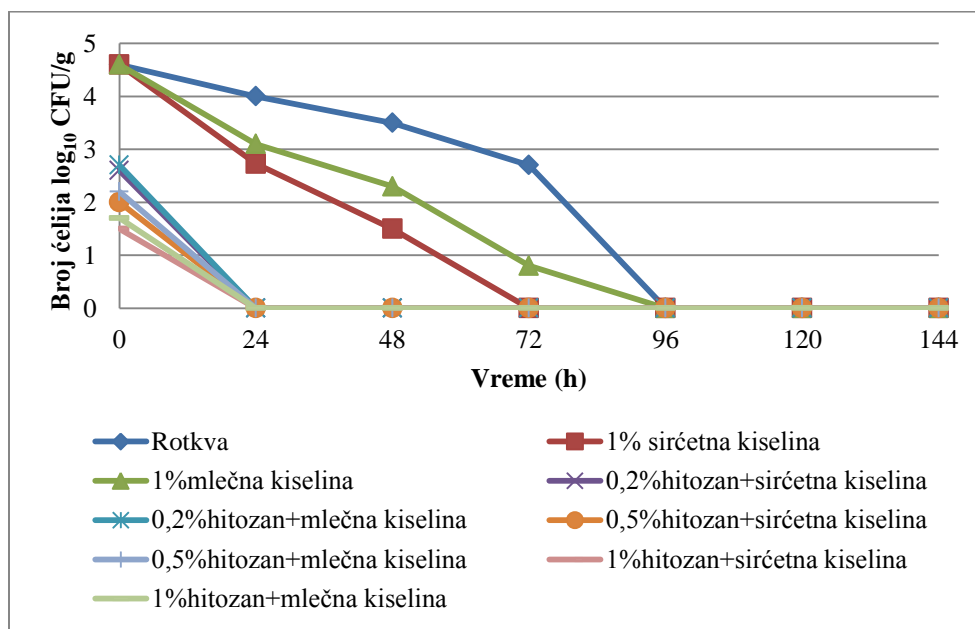
Nakon 24h skladištenja, prosečan broj ispitivane bakterijske vrste se nije mogao detektovati ni u jednom uzorku rotkve sa dodatkom hitozana. Sama rotkva, bez dodatog hitozana u potpunosti je inhibirala *L. monocytogenes* ATCC 19115 za 96h skladištenja.

Iz rezultata prikazanih na Grafiku 5, može se videti da brojnost populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 veoma brzo opada u kontrolnom uzorku rotkve. Dodatak sirćetne ili mlečne kiseline takođe doprinosi smanjenju broja ispitivanog mikroorganizma, u poređenju sa kontrolom. Između svih uzoraka kojima su dodate organske kiseline i kontrole (rotkva) postoji statistički značajna razlika.

Sve upotrebljene koncentracije hitozana omogućile su inaktivaciju *L. monocytogenes* ATCC 19115 u crnoj rotkvi, jer se već nakon 24h od dodatka hitozana, ispitivani soj bakterija nije mogao detektovati u ovom povrću. Ovakav trend je zadržan

tokom celog perioda ispitivanja od 120h. Najveće smanjenje je uočeno kod uzoraka kojima je dodat 1 % hitozan pripremljen sa sirćetnom kiselinom. Ova koncentracija hitozana u poređenju sa kontrolnim uzorkom rotkve koji nije tretiran hitozanom, izaziva smanjenje početnog broja *Listeria* za 3,1 log<sub>10</sub> CFU/g. Na nivou značajnosti 0,05 i sa verovatnoćom od P>95% može se tvrditi da je ova razlika statistički značajna.

Kod uzoraka kojima je dodat 1% hitozan pripremljen sa mlečnom kiselinom, može se uočiti da je brojnost populacije ispitivanih bakterija smanjena u nešto manjem iznosu u poređenju sa istom koncentracijom hitozana pripremljenog sa sirćetnom kiselinom. Međutim, ova razlika nije bila statistički značajna. Hitozan u koncentraciji od 0,5% koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom izaziva smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 2,6 log<sub>10</sub> CFU/g dok ista koncentracija hitozana sa mlečnom kiselinom izaziva smanjenje od 2,4 log<sub>10</sub> CFU/g. Na nivou značajnosti 0,05 i sa verovatnoćom od 95% može se tvrditi da postoji statistički značajna razlika između svih upotrebljenih koncentracija hitozana koji su pripremljeni sa sirćetnom odnosno mlečnom kiselinom.



**Grafik 5. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u crnoj rotkvi u prisustvu omotača sa različitim koncentracijama hitozana**

Najmanja vrednost inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 ostvarena je sa 0,25% hitozanom. Pri tom, 0,25% hitozan pripremljen sa sirćetnom kiselinom odmah nakon dodatka u povrće izaziva smanjenje početnog broja bakterija od 2 log<sub>10</sub> CFU/g, dok je za hitozan sa mlečnom kiselinom ovo smanjenje iznosilo 1,9 log<sub>10</sub> CFU/g.

Poređenjem dobijenih vrednosti smanjenja broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 za iste koncentracije hitozana koje su pripremljene sa različitim vrstama organskih kiselina utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika na nivou p<0,05.

Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj rotkvi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1% prikazani su u Tabeli 11 (Grafik 6).

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 11. utvrđeno je da se prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj crnoj rotkvi (kontrola), značajno razlikuje na nivou p<0,05, od svih ispitivanih uzoraka koji su tretirani hitozanom.

**Tabela 11. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj crnoj rotkvi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1%**

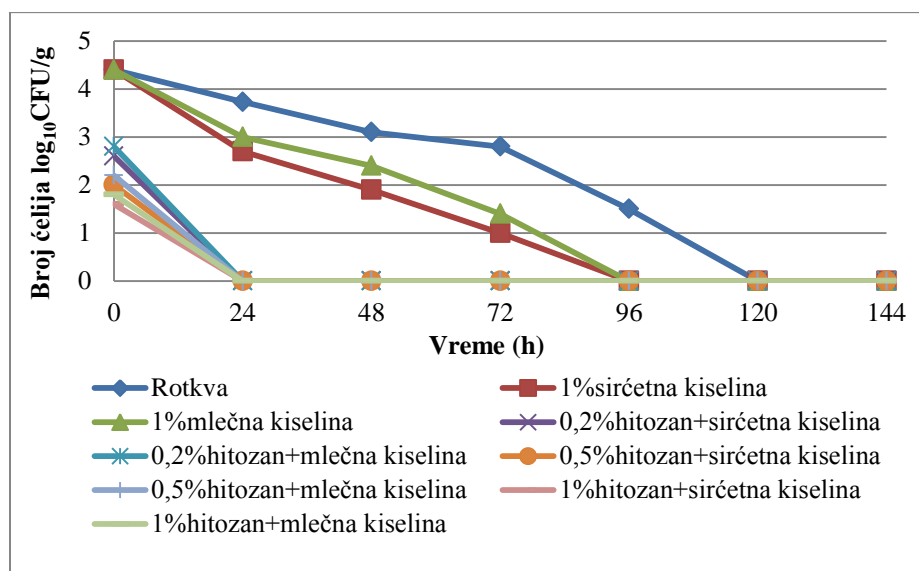
Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (log <sub>10</sub> CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Crna rotkva	4.40±0.09 <sup>a</sup>	3.73±0.05 <sup>a</sup>	3.10±0.12 <sup>a</sup>	2.80±0.05 <sup>a</sup>	1.53±0.06 <sup>a</sup>	ND	ND
1% sirćetna kiselina	4.40±0.06 <sup>a,b</sup>	2.70±0.05 <sup>b</sup>	1.90±0.13 <sup>b</sup>	0.80±0.70 <sup>b,c</sup>	ND	ND	ND
1% mlečna kiselina	4.40±0.06 <sup>a,b</sup>	3.02±0.16 <sup>c</sup>	2.40±0.10 <sup>c</sup>	1.40±0.11 <sup>b,c</sup>	ND	ND	ND
0.25% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.60±0.03 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.25% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.80±0.02 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.5% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.00±0.11 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.5% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.20±0.12 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1% hitozan sa sirćetnom kiselinom	1.60±0.24 <sup>g,h</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1% hitozan sa mlečnom kiselinom	1.80±0.10 <sup>g,h</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju (p < 0.05), ND – ne može se detektovati

Iz prikazanih rezultata (Grafik 6), može se uočiti da sveže sečena rotkva izaziva smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 0,7 log<sub>10</sub> CFU/g za 24h

odnosno  $1,3 \log_{10}$  CFU/g za 48h. Dodatak 1% sirćetne ili 1% mlečne kiseline značajno je doprineo smanjenju početnog broja bakterija u ovom povrću. Na osnovu statističke analize, sa sigurnošću  $P > 95\%$  može se tvrditi da postoji statistički značajna razlika između kontrolnog uzorka (rotkva) i uzoraka kojima su dodate ove organske kiseline.

Između svih uzoraka kojima je dodat hitozan u različitim koncentracijama i kontrolnog uzorka rotkve postoji statistički značajna razlika. Sa sigurnošću od 95% se može tvrditi da sve upotrebljene koncentracije hitozana, bez obzira na tip organske kiseline koja je upotrebljena kao rastvarač, značajno utiču na inhibiciju soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj rotkvi. Odmah nakon dodatka 1% hitozana koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom ostvareno je smanjenje brojnosti bakterijske populacije od  $2,8 \log_{10}$  CFU/g, dok kod 1% hitozana koji je pripremljen sa mlečnom kiselinom, ovo smanjenje iznosi  $2,6 \log_{10}$  CFU/g.



**Grafik 6. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 u crnoj rotkvi u prisustvu omotača sa različitim koncentracijama hitozana**

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 6), može se uočiti da hitozan u koncentraciji od 1% uspešno inhibira rast ispitivanog bakterijskog soja tokom celog perioda ispitivanja (120h). Kod 0,5% hitozana koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom, smanjenje brojnosti populacije odmah na početku ispitivanja je iznosilo  $2,4 \log_{10}$  CFU/g, dok je kod 0,5%

hitozana sa mlečnom kiselinom utvrđeno smanjenje početnog broja *Listeria* od 2,2 log<sub>10</sub> CFU/g. Primenjene koncentracije hitozana od 0,5% takođe su uspešno inhibirale rast ispitivanog soja *Listeria* tokom celog perioda ispitivanja (120h).

Najmanja vrednost inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 ostvarena je sa 0,25% hitozanom. Pri tom, 0,25% hitozan pripremljen sa sirćetnom kiselinom odmah nakon dodatka u povrće izazvao je smanjenje početnog broja bakterija od 1,8 log<sub>10</sub> CFU/g, dok je za hitozan sa mlečnom kiselinom ovo smanjenje iznosilo 1,6 log<sub>10</sub> CFU/g.

Poređenjem dobijenih vrednosti smanjenja broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 za iste koncentracije hitozana koje su pripremljene sa različitim vrstama organskih kiselina utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika na nivou p<0,05.

### 5.3.2. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na šargarepi u prisustvu omotača hitozana

Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1% prikazani su u Tabeli 12 (Grafik 7).

**Tabela 12. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1%**

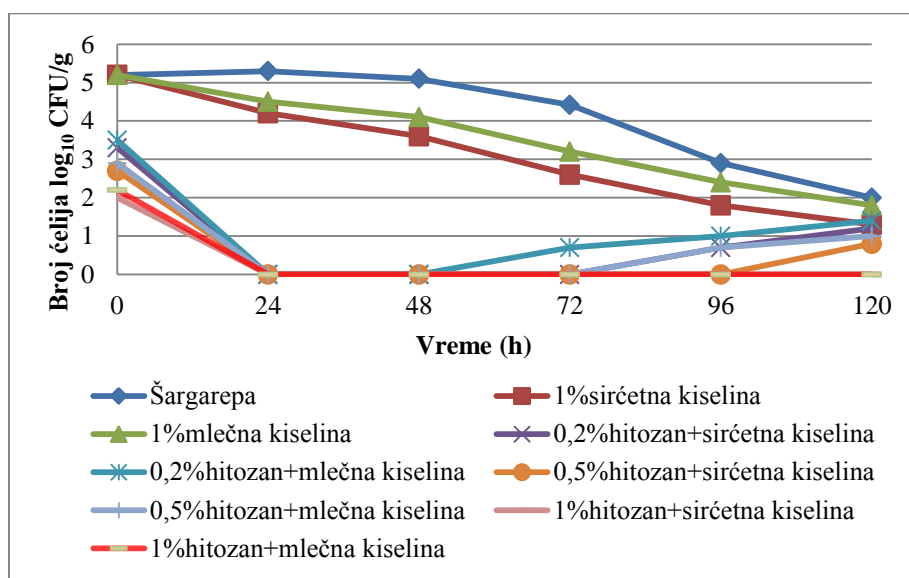
Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 (log <sub>10</sub> CFU/g)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
Šargarepa	5.20±0.04 <sup>a</sup>	5.30±0.08 <sup>a</sup>	5.10±0.05 <sup>a</sup>	4.40±0.04 <sup>a</sup>	2.90±0.03 <sup>a</sup>	2.00±0.11 <sup>a</sup>
1% sirćetna kiselina	5.20±0.04 <sup>a,b</sup>	4.20±0.10 <sup>b</sup>	3.60±0.04 <sup>b</sup>	2.60±0.03 <sup>b</sup>	1.80±0.10 <sup>b</sup>	1.30±0.24 <sup>b</sup>
1% mlečna kiselina	5.20±0.06 <sup>a,b,c</sup>	4.50±0.07 <sup>c</sup>	4.10±0.10 <sup>c</sup>	3.20±0.06 <sup>c</sup>	2.40±0.08 <sup>c</sup>	1.80±0.07 <sup>c</sup>
0,25% hitozan sa sirćetnom kiselinom	3.30±0.08 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>d</sup>	1.20±0.17 <sup>d</sup>
0,25% hitozan sa mlečnom kiselinom	3.50±0.05 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	1.00±0.00 <sup>e</sup>	1.40±0.10 <sup>e</sup>
0,5% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.70±0.02 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND	0.80±0.00 <sup>f</sup>
0,5% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.90±0.03 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>e,f</sup>	1.00±0.00 <sup>g</sup>
1% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.00±0.12 <sup>h</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
1% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.20±0.08 <sup>h,i</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju (p < 0.05), ND – ne može se detektovati.

Na početku ispitivanja utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju *L. monocytogenes* ATCC 19115 između uzoraka sveže sečene šargarepe i uzoraka kojima su dodate organske kiseline. Prosečan broj ispitivane bakterijske vrste u svim uzorcima koji su tretirani hitozanom bio je statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ) od kontrolnog uzorka šargarepe koji nije tretiran hitozanom.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 7), može se zapaziti da sama sveže sečena šargarepa izaziva smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od  $3,2 \log_{10}$  CFU/g u toku 120 h skladištenja na  $4^{\circ}\text{C}$ . Sirćetna i mlečna kiselina koje su dodate u povrće u koncentraciji od 1%, dovode do smanjenja brojnosti populacije *Listeria sp.* tokom celog perioda ispitivanja. Na osnovu statističke analize, sa sigurnošću od 95% se može tvrditi da postoji značajna razlika između kontrolnog uzorka (šargarepa) i uzoraka kojima su dodate organske kiseline. Ipak, dodatkom 1% sirćetne kiseline, postiže se veća inhibicija ispitivanog bakterijskog soja nego sa mlečnom kiselinom u istoj koncentraciji.



**Grafik 7. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u šargarepi u prisustvu omotača sa različitim koncentracijama hitozana**

Na početku ispitivanja, dodatak 1% hitozana koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom izazvao je smanjenje ukupnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od  $3,2 \log_{10}$  CFU/g, dok kod hitozana koji je u istoj koncentraciji pripremljen sa mlečnom kiselinom,

ovo smanjenje je iznosilo 3 log<sub>10</sub> CFU/g. Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 7), može se videti da hitozan u koncentraciji od 1% uspešno inhibira rast ispitivanog soja *Listeria* tokom celog ispitivanja (120h).

Kod koncentracije hitozana od 0,5% koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom, smanjenje brojnosti populacije odmah na početku ispitivanja je iznosilo 2,5 log<sub>10</sub> CFU/g, dok je kod 0,5% hitozana sa mlečnom kiselinom zabeleženo smanjenje početnog broja *Listeria* od 2,3 log<sub>10</sub> CFU/g. Primenjene koncentracije hitozana od 0,5% sa mlečnom ili sirćetnom kiselinom inhibirale su rast ispitivanog soja *Listeria* u toku prvih 72h. Nakon ovog vremena utvrđen je porast ukupnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u ovim uzorcima šargarepe. Iz prikazanih rezultata (Grafik 7), može se uočiti da najmanje koncentracije hitozana pokazuju najslabiju inhibitornu aktivnost. Odmah nakon dodatka hitozana u koncentraciji od 0,25% ostvareno je smanjenje početnog broja *Listeria* od 1,7 log<sub>10</sub> CFU/g za uzorak koji je pripremljen sa mlečnom kiselinom, odnosno 1,9 log<sub>10</sub> CFU/g za uzorak koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom. U prvih 48h, na temperaturi od 4°C, koncentracija hitozana od 0,25%, bez obzira na organsku kiselinu koja je upotrebljena kao rastvarač, uspešno inhibira rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 u šargarepi. Nakon ovog perioda uočava se povećanje ukupnog broja ispitivane bakterijske vrste u uzorcima sa 0,25% hitozana.

Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1% prikazani su u Tabeli 13 (Grafik 8).

Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj šargarepi, nije se statistički značajno razlikovao ( $p < 0,05$ ) od uzoraka kojima je dodata sirćetna ili mlečna kiselina, u nultom trenutku ispitivanja (0h).

Utvrđeno je da je prosečan broj ispitivane bakterijske vrste u svim uzorcima šargarepe koji su tretirani omotačima hitozana, statistički značajno manji ( $p < 0,05$ ) od kontrolnog uzorka šargarepe koji nije tretiran hitozanom.

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 8) može se uočiti da sveže sečena šargarepa izaziva smanjenje ukupnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 1,5 log<sub>10</sub> CFU/g, za

vreme od 120h. Dodatak 1% sirćetne ili 1% mlečne kiseline u povrće takođe dovodi do smanjenja ukupnog broja *Listeria* tokom celog perioda ispitivanja.

**Tabela 13. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1%**

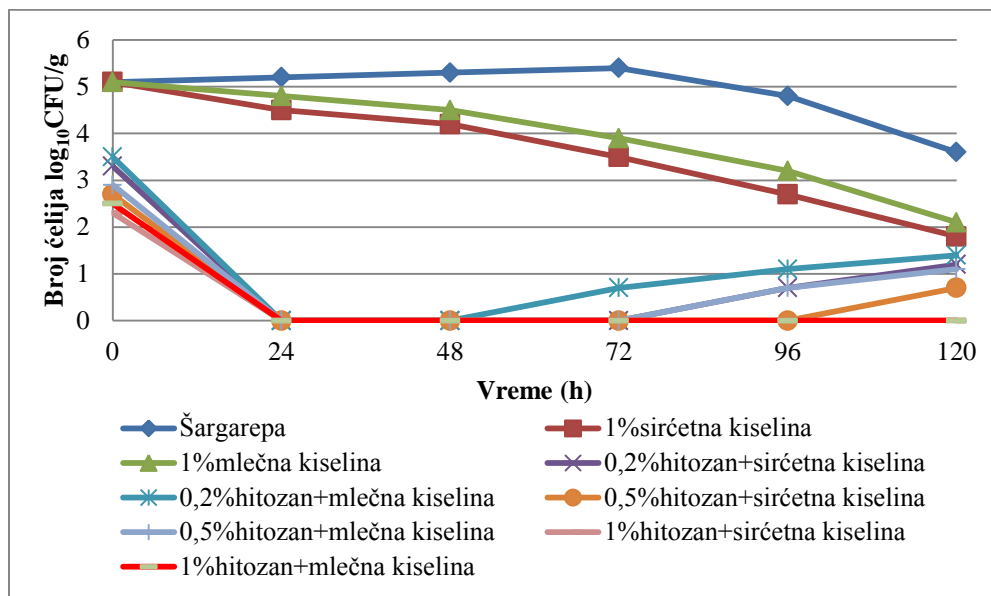
Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (log <sub>10</sub> CFU/g)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
Šargarepa	5.10±0.07 <sup>a</sup>	5.20±0.07 <sup>a</sup>	5.30±0.07 <sup>a</sup>	5.40±0.05 <sup>a</sup>	4.80±0.03 <sup>a</sup>	3.60±0.03 <sup>a</sup>
1% sirćetna kiselina	5.10±0.08 <sup>ab</sup>	4.50±0.03 <sup>b</sup>	4.20±0.06 <sup>b</sup>	3.50±0.03 <sup>b</sup>	2.70±0.02 <sup>b</sup>	1.80±0.18 <sup>b</sup>
1% mlečna kiselina	5.10±0.08 <sup>ab</sup>	4.80±0.04 <sup>c</sup>	4.50±0.05 <sup>c</sup>	3.90±0.02 <sup>c</sup>	3.20±0.06 <sup>c</sup>	2.10±0.12 <sup>c</sup>
0,25% hitozan sa sirćetnom kiselinom	3.30±0.08 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>d</sup>	1.20±0.17 <sup>d</sup>
0,25% hitozan sa mlečnom kiselinom	3.50±0.05 <sup>d</sup>	ND	ND	0.70±0.60 <sup>e</sup>	1.10±0.17 <sup>e</sup>	1.40±0.10 <sup>e</sup>
0,5% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.70±0.04 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>f</sup>
0,5% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.90±0.02 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>g</sup>	1.10±0.17 <sup>g</sup>
1% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.30±0.14 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
1% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.50±0.09 <sup>g,h</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Na osnovu statističke analize, sa sigurnošću  $P > 95\%$  se može tvrditi da postoji statistički značajna razlika između kontrolnog uzorka (šargarepa) i uzoraka kojima su dodate ove organske kiseline. Dodatkom 1% sirćetne kiseline ostvarena je veća inhibicija ispitivanog bakterijskog soja nego pri dodatku 1% mlečne kiseline. Takođe, postoji statistički značajna razlika između svih uzoraka kojima je dodat hitozan i kontrolnog uzorka šargarepe.

Sve upotrebljene koncentracije hitozana dovode do značajnog smanjenja početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 u šargarepi. Na početku ispitivanja, nakon dodatka 1% hitozana koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom utvrđeno je smanjenje ukupnog broja *Listeria* od 2,8 log<sub>10</sub> CFU/g, dok kod hitozana koji je u istoj koncentraciji pripremljen sa mlečnom kiselinom, ovo smanjenje je iznosilo 2,6 log<sub>10</sub> CFU/g. Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 8), može se videti da hitozan u koncentraciji od 1% uspešno inhibira rast ispitivanog soja *Listeria* tokom celog perioda ispitivanja (120h).





**Grafik 8. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 u šargarepi u prisustvu omotača sa različitim koncentracijama hitozana**

Kod 0,5% hitozana koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom, smanjenje brojnosti populacije odmah na početku ispitivanja je iznosilo 2,4 log<sub>10</sub> CFU/g, dok je kod 0,5% hitozana sa mlečnom kiselinom zabeleženo smanjenje početnog broja bakterija od 2,2 log<sub>10</sub> CFU/g. Ipak, treba naglasiti da primenjene koncentracije hitozana od 0,5% sa mlečnom ili sirćetnom kiselinom, inhibiraju rast ispitivanog soja u toku prvih 72h. Nakon ovog vremena zabeležen je porast broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 u šargarepi. Međutim, ovo povećanje brojnosti bakterijske populacije, nije statistički značajno u poređenju sa uzorcima u kojima *Listeria* nije bila detektovana. Može se videti da najmanje koncentracije hitozana pokazuju najslabiju inhibitornu aktivnost (Grafik 8). Odmah nakon dodatka hitozana u koncentraciji od 0,25% ostvareno je smanjenje početnog broja *Listeria* od 1,6 log<sub>10</sub> CFU/g za uzorak koji je pripremljen sa mlečnom kiselinom, odnosno 1,8 log<sub>10</sub> CFU/g za uzorak koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom. U prvih 48h, na temperaturi od 4°C, koncentracija hitozana od 0,25%, bez obzira na organsku kiselinu koja je upotrebljena kao rastvarač, uspešno inhibira rast *L. monocytogenes* ATCC 19112 u šargarepi. Nakon ovog perioda uočava se povećanje brojnosti populacije *Listeria* u uzorcima sa 0,25% hitozana.

### 5.3.3. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na kupusu u prisustvu omotača hitozana

Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenom kupusu u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1% prikazani su u Tabeli 14 (Grafik 9).

Na početku ispitivanja nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnog ukupnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenom kupusu i uzorcima kojima su dodate sirćetna ili mlečna kiselina. Prosečan ukupan broj ispitivanih bakterija u uzorcima kupusa bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog ukupnog broja bakterija u uzorcima kupusa koji su tretirani različitim koncentracijama hitozana.

**Tabela 14. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenom kupusu u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1%**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
Kupus	5.70±0.03 <sup>a</sup>	5.80±0.04 <sup>a</sup>	7.20±0.08 <sup>a</sup>	8.40±0.04 <sup>a</sup>	9.10±0.09 <sup>a</sup>	9.40±0.10 <sup>a</sup>
1% sirćetna kiselina	5.70±0.03 <sup>a</sup>	5.00±0.09 <sup>b</sup>	5.70±0.03 <sup>b</sup>	6.40±0.06 <sup>b</sup>	7.10±0.06 <sup>b</sup>	7.60±0.07 <sup>b</sup>
1% mlečna kiselina	5.70±0.03 <sup>a</sup>	5.50±0.06 <sup>c</sup>	6.50±0.05 <sup>c</sup>	7.40±0.07 <sup>c</sup>	8.50±0.08 <sup>c</sup>	8.80±0.06 <sup>c</sup>
0,25% hitozan sa sirćetnom kiselinom	3.80±0.03 <sup>b</sup>	ND	ND	0.80±0.70 <sup>d</sup>	1.60±0.11 <sup>d</sup>	2.00±0.09 <sup>d</sup>
0,25% hitozan sa mlečnom kiselinom	3.90±0.02 <sup>c</sup>	ND	ND	1.30±0.24 <sup>e,d</sup>	1.80±0.04 <sup>e</sup>	2.30±0.03 <sup>e</sup>
0,5% hitozan sa sirćetnom kiselinom	3.10±0.09 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	1.00±0.00 <sup>f</sup>	1.40±0.10 <sup>f</sup>
0,5% hitozan sa mlečnom kiselinom	3.20±0.09 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	1.20±0.17 <sup>g</sup>	1.60±0.11 <sup>g,f</sup>
1% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.70±0.04 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	0.80±0.60 <sup>h</sup>	1.10±0.17 <sup>h</sup>
1% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.90±0.02 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	1.30±0.24 <sup>g,h,i</sup>	1.50±0.15 <sup>g,h,i</sup>

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

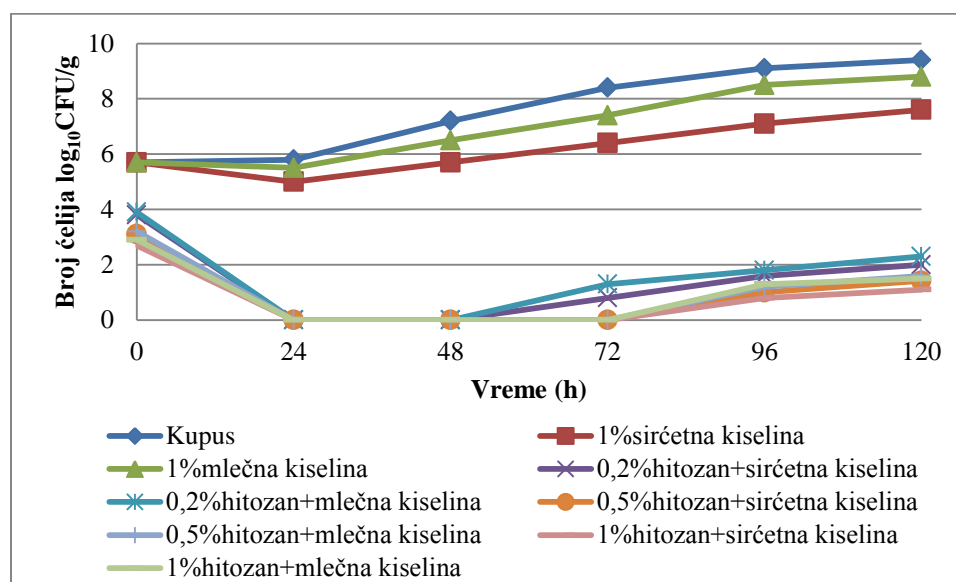
Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ), ND – ne može se detektovati.

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 9), može se videti da sve upotrebljene koncentracije hitozana, u obliku omotača, značajno doprinose smanjenju brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu. Kod 1% hitozana koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom utvrđeno je smanjenje početnog broja bakterija od 3  $\log_{10}$  CFU/g,

odmah nakon dodatka hitozana u povrće, odnosno kod 0,5% hitozana smanjenje je iznosilo 2,6 log<sub>10</sub> CFU/g.

Kod uzoraka kupusa kod kojih je dodat 1% hitozan sa mlečnom kiselinom smanjenje početnog broja *Listeria sp.* je iznosilo 2,8 log<sub>10</sub> CFU/g odmah nakon dodatka hitozana u povrće, odnosno kod 0,5% hitozana sa mlečnom kiselinom smanjenje je iznosilo 2,5 log<sub>10</sub> CFU/g.

Najslabija inhibitorna aktivnost za soj *L. monocytogenes* ATCC 19115, uočena je kod omotača koji su pripremljeni sa 0,25% hitozana. Ova koncentracija hitozana, bez obzira na upotrebljenu kiselinu, ispoljava antimikrobnu aktivnost samo u prvih 48h skladištenja kupusa na temperaturi od 4°C.



**Grafik 9. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu u prisustvu omotača sa različitim koncentracijama hitozana**

Nakon ovog vremena, uočava se porast bakterijske populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu. Međutim, ovo povećanje nije statistički značajno u poređenju sa uzorcima u kojima *L. monocytogenes* ATCC 19115 nije bila detektovana. Kod uzoraka kupusa kod kojih je hitozan primenjen u koncentracijama od 0,5% i 1%, takođe je zapažen porast bakterijske populacije nakon 72h skladištenja.

Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenom kupusu u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1% prikazani su u Tabeli 15 (Grafik 10).

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 15, utvrđeno je da se prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenom kupusu (kontrola), značajno razlikuje od svih ispitivanih uzoraka koji su tretirani hitozanom ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 15. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenom kupusu u prisustvu omotača hitozana u koncentracijama od 0,25%, 0,5% i 1%**

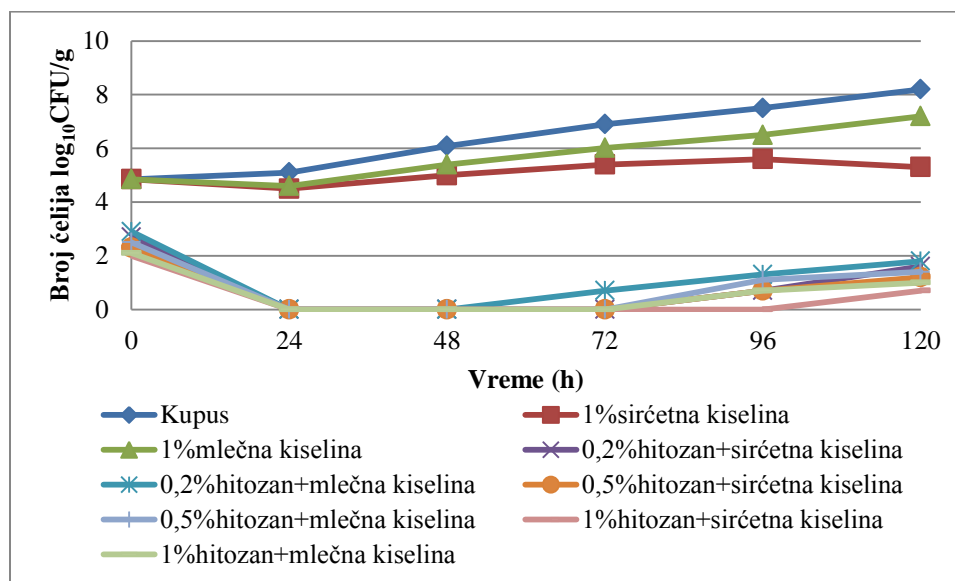
Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
Kupus	4.85±0.02 <sup>a</sup>	5.10±0.07 <sup>a</sup>	6.09±0.06 <sup>a</sup>	6.90±0.02 <sup>a</sup>	7.50±0.06 <sup>a</sup>	8.20±0.04 <sup>a</sup>
1% sirćetna kiselina	4.85±0.02 <sup>a</sup>	4.50±0.03 <sup>b</sup>	5.00±0.03 <sup>b</sup>	5.40±0.03 <sup>b</sup>	5.60±0.02 <sup>b</sup>	5.30±0.04 <sup>b</sup>
1% mlečna kiselina	4.85±0.02 <sup>a</sup>	4.60±0.03 <sup>b,c</sup>	5.40±0.01 <sup>c</sup>	6.02±0.07 <sup>c</sup>	6.50±0.04 <sup>c</sup>	7.20±0.06 <sup>c</sup>
0,25% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.70±0.02 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>d</sup>	1.60±0.11 <sup>d</sup>
0,25% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.90±0.02 <sup>c</sup>	ND	ND	0.70±0.60 <sup>e</sup>	1.30±0.30 <sup>e,d</sup>	1.80±0.09 <sup>d,e</sup>
0,5% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.30±0.04 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>f</sup>	1.20±0.17 <sup>f</sup>
0,5% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.50±0.04 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	1.10±0.17 <sup>g,f</sup>	1.40±0.10 <sup>e,f,g</sup>
1% hitozan sa sirćetnom kiselinom	2.00±0.05 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>f,h</sup>
1% hitozan sa mlečnom kiselinom	2.10±0.02 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	0.70±0.60 <sup>i</sup>	1.00±0.00 <sup>g,h,i</sup>

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 10) može se zaključiti da sve upotrebljene koncentracije hitozana značajno doprinose smanjenju brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 u kupusu, u prvih 48h. Kod 1% hitozana koji je pripremljen sa sirćetnom kiselinom, utvrđeno je smanjenje početnog broja *Listeria* od 2,8  $\log_{10}$  CFU/g odmah nakon dodatka hitozana u povrće, odnosno kod 0,5% hitozana smanjenje je iznosilo 2,5  $\log_{10}$  CFU/g. Kod uzoraka kupusa kod kojih je dodat 1% hitozan sa mlečnom kiselinom smanjenje početnog broja *Listeria* je iznosilo 2,7  $\log_{10}$  CFU/g odmah nakon dodatka hitozana u povrće, odnosno kod 0,5% hitozana sa mlečnom kiselinom smanjenje je iznosilo

2,3 log<sub>10</sub> CFU/g. Dodatak 1% sirćetne ili 1% mlečne kiseline u povrće u početnom trenutku ispitivanja (0h) nije značajno uticao na smanjenje broja *Listeria* u kupusu. Utvrđeno je da između istih koncentracija hitozana koji su pripremljeni sa različitim vrstama organskih kiselina postoji statistički značajna razlika na nivou p<0,05.



**Grafik 10. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 u kupusu u prisustvu omotača sa različitim koncentracijama hitozana**

Iz prikazanih rezultata (Grafik 10), može se zapaziti da najslabiju inhibitornu aktivnost na rast *L. monocytogenes* ATCC 19112 ispoljava najniža ispitivana koncentracija hitozana. Bez obzira na upotrebljenu kiselinu, 0,25% hitozan ispoljava antimikrobnu aktivnost samo u prvih 48h skladištenja kupusa, na temperaturi od 4°C. Nakon ovog vremena, uočava se porast bakterijske populacije u uzorcima sa najnižim dodatim koncentracijama hitozana (0,25%). Međutim, ovo povećanje brojnosti bakterijske populacije, nije statistički značajno u poređenju sa uzorcima u kojima *Listeria* nije bila detektovana. Kod uzoraka kupusa kod kojih je hitozan primenjen u koncentraciji od 1%, takođe je zapažen porast bakterijske populacije nakon 72h skladištenja.

#### 5.4. Sposobnost rasta sojeva *L. monocytogenes* u povrću u prisustvu kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja

##### 5.4.1. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na rotkvi u prisustvu 0,5% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 16 (Grafik 11).

Na početku ispitivanja nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između prosečnog broja bakterija u uzorcima rotkve i uzoraka koji su tretirani hitozanom. Nakon 24h skladištenja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između prosečnog broja bakterija u uzorcima rotkve i prosečnog broja bakterija u svim upotrebljenim formulacijama filma hitozana.

**Tabela 16. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj crnoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Rotkva	5.00±0.09 <sup>a</sup>	4.40±0.09 <sup>a</sup>	3.92±0.08 <sup>a</sup>	2.90±0.11 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan	5.00±0.09 <sup>a</sup>	3.80±0.10 <sup>b</sup>	1.90±0.13 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kis.	5.00±0.09 <sup>a</sup>	3.70±0.08 <sup>c,b</sup>	2.20±0.10 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% mente	5.00±0.09 <sup>a</sup>	3.50±0.06 <sup>d</sup>	1.30±0.24 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% mente	5.00±0.09 <sup>a</sup>	3.30±0.09 <sup>e</sup>	1.10±0.17 <sup>d,e</sup>	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% timijana	5.00±0.09 <sup>a</sup>	3.00±0.09 <sup>f</sup>	0.90±0.80 <sup>d,e,f</sup>	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% timijana	5.00±0.09 <sup>a</sup>	2.00±0.13 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

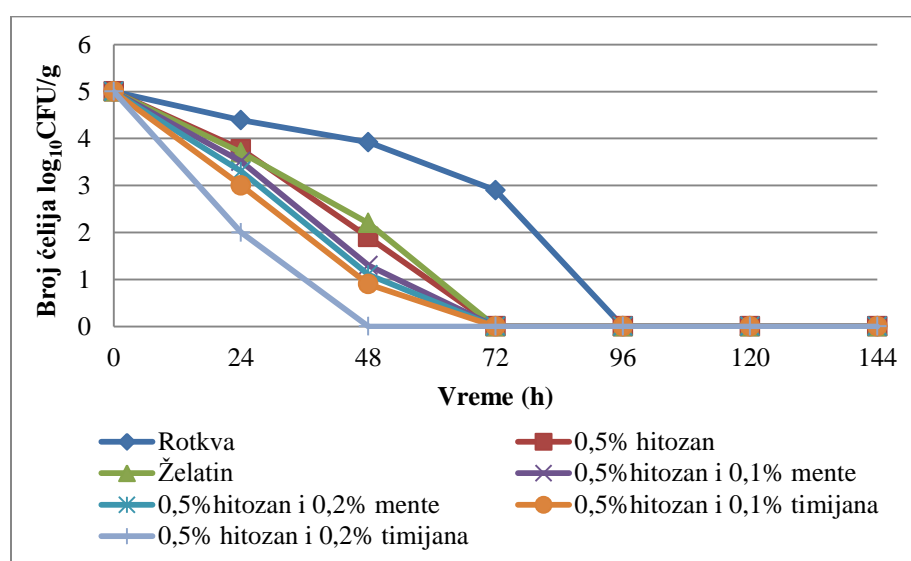
Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

U vremenskom period od 24h nije utvrđena statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka rotkve koji su tretirani 0,5% hitozanom i uzoraka koji su tretirani filmom želatina koji je pripremljen sa 1 % sirćetnom kiselinom.

Nakon 48h ispitivanja, utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija u uzorcima rotkve i svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova sa hitozanom. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina sa

sirćetnom kiselinom bio je značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana. Za vremenski period od 48h nije utvrđena statistički značajna razlika između upotrebljenih koncentracija etarskih ulja koje su primenjene u filmovima hitozana. Potpuna inhibicija ukupnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 postignuta je sa 0,5% filmom hitozana nakon 72h skladištenja na temperaturi od 4°C.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 11), može se videti da sama crna rotkva ispoljava snažnu antilisterijsku aktivnost, što dovodi do brzog opadanja početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115. Potpuna inhibicija se postiže za vreme od 96h (4. dan).



**Grafik 11. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma sa 0,5% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Sama sirćetna kiselina koja je prisutna u želatinu, smanjuje početni broj *Listeria monocytogenes* za 1,3 log<sub>10</sub> CFU/g u toku 24h odnosno za 2,8 log<sub>10</sub> CFU/g za 48h. Primenjeni film sa hitozanom u koncentraciji od 0,5% u toku prvih 24h skladištenja izaziva smanjenje početnog broja bakterijske vrste od 1,2 log<sub>10</sub> CFU/g, dok je smanjenje za 48h iznosilo 3,1 log<sub>10</sub> CFU/g.

Sa sigurnošću od 95% može se tvrditi da ostvarena razlika u brojnosti bakterijske populacije u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom i samog 0,5% filma hitozana u prvih 24h, nije statistički značajna. Na osnovu prikazanih

rezultata (Grafik 11), može se videti da u toku prvih 24h skladištenja, koncentracija hitozana od 0,5% nije bila efikasna u smanjenju broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u rotkvi.

Skladištenjem rotkve u prisustvu 0,5% filma hitozana ostvareno je smanjenje brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 2 log<sub>10</sub> CFU/g u poređenju sa samom crnom rotkvom (kontrola), u toku 48h. S obzirom na to da sama sirćetna kiselina koja je prisutna u želatinu u istom periodu izaziva smanjenje brojnosti bakterijske populacije od 0,3 log<sub>10</sub> CFU/g u poređenju sa filmom hitozana, može se videti da sam 0,5% hitozan ispoljava slabu antimikrobnu aktivnost. Potpuna inhibicija ispitivanog soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorku koji je skladišten sa filmom hitozana ostvarena je nakon 72h.

Dodatak etarskih ulja mente i timijana utiče na povećanje antimikrobne aktivnosti filma hitozana. Između svih uzoraka hitozana i hitozana sa dodatkom etarskih ulja, postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ). Najefikasnije smanjenje ukupnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 ostvareno je sa formulacijom filma koja je pripremljena sa etarskim uljem timijana u koncentraciji od 0,2%. Ovaj film izaziva smanjenje početnog broja bakterija od 2,5 log<sub>10</sub> CFU/g u prvih 24h dok se nakon 48h, *L. monocytogenes* ATCC 19115 više nije mogla detektovati u uzorcima ovog povrća.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma od 0,5% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 17 (Grafik 12).

Za prvih 24 h utvđena je statistički značajna razlika prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 između svih uzoraka koji su tretirani 0,5% filmovima hitozana i kontrolnog uzorka crne rotkve. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim u prisustvu 0,5% hitozana. Nije utvrđena statistički značajna razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 između uzoraka tretiranih filmom 0,5% hitozana i filma sa dodatkom 0,1% etarskim uljem mente.

Za 48h prosečan broj bakterija u uzorcima rotkve bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu ispitivanih filmova



hitozana, na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina i sirćetne kiseline bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim u prisustvu 0,5% hitozana. Između uzoraka crne rotkve koji su tretirani samim 0,5% hitozanom uzorcima sadodatim etarskim uljima utvrđena je statistički značajna razlika.

Za 72h skladištenja, prosečan broj bakterija u uzorcima rotkve bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu ispitivanih filmova hitozana, na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina i sirćetne kiseline bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim u prisustvu 0,5% hitozana.

**Tabela 17. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj crnoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Rotkva	4.70±0.08 <sup>a</sup>	4.00±0.09 <sup>a</sup>	3.40±0.11 <sup>a</sup>	2.80±0.05 <sup>a</sup>	1.80±0.11 <sup>a</sup>	ND	ND
0,5% hitozan	4.70±0.08 <sup>a</sup>	3.60±0.11 <sup>b</sup>	2.40±0.10 <sup>b</sup>	0.80±0.70 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	4.70±0.08 <sup>a</sup>	3.80±0.07 <sup>a,c</sup>	2.79±0.05 <sup>c</sup>	1.70±0.13 <sup>c</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% mente	4.70±0.08 <sup>a</sup>	3.60±0.08 <sup>b,d</sup>	1.70±0.13 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% mente	4.70±0.08 <sup>a</sup>	3.50±0.09 <sup>b,e</sup>	1.52±0.20 <sup>d,e</sup>	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% timijana	4.70±0.08 <sup>a</sup>	3.20±0.11 <sup>f</sup>	1.20±0.17 <sup>e,f</sup>	ND	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% timijana	4.70±0.08 <sup>a</sup>	2.90±0.13 <sup>g</sup>	1.00±0.00 <sup>e,f,g</sup>	ND	ND	ND	ND

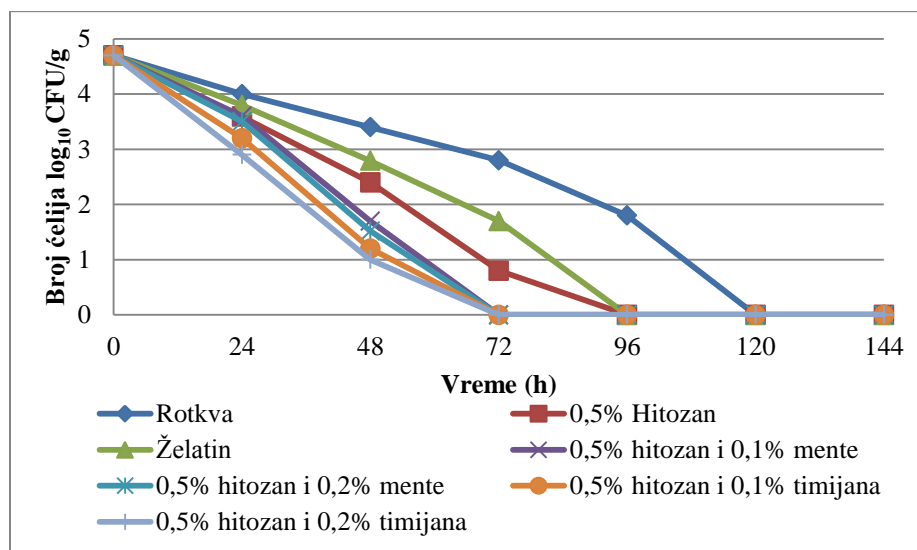
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ), ND – ne može se detektovati.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 12), može se uočiti da sama crna rotkva izaziva brzu inhibiciju početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 koji se smanjio za 0,7  $\log_{10}$  CFU/g, 1,3  $\log_{10}$  CFU/g odnosno 1,9  $\log_{10}$  CFU/g za vreme od 24 h, 48 h odnosno 72h. Potpuna inhibicija ispitivanog bakterijskog soja u uzorcima crne rotkve postignuta je za 120h.

U poređenju sa rezultatima koji su prikazani na Grafiku 11, za soj *L. monocytogenes* ATCC 19115, može se zaključiti da između ispitivanih sojeva postoji razlika u sposobnosti

njihovog preživljavanja na ovom povrću. Veću otpornost pokazuje soj *L.monocytogenes* ATCC 19112 kod koga je vreme odumiranja duže za 24h u poređenju sa sojem *L. monocytogenes* ATCC 19115. Takođe, vrednost korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na crnoj rotkvi ( $r = 0,95$ ), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.



**Grafik 12. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma sa 0,5% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 12), može se zapaziti da 0,5% film hitozana izaziva smanjenje brojnosti *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 0,4  $\log_{10}$  CFU/g, 1  $\log_{10}$  CFU/g odnosno 1,8  $\log_{10}$  CFU/g, za vreme od 24h, 48h odnosno 72h, u poređenju sa crnom rotkvom (kontrola). Na osnovu dobijenih rezultata, može se tvrditi da je ostvarena razlika u brojnosti bakterijske populacije između crne rotkve (kontrola) i svih formulacija kompozitnih filmova hitozana statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 između uzoraka skladištenih u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom i 0,5% hitozana iznosila je 0,3  $\log_{10}$  CFU/g za 24h, 0,4  $\log_{10}$  CFU/g za 48h odnosno 0,7  $\log_{10}$  CFU/g za 72h. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da

sam hitozan u koncentraciji od 0,5% ispoljava slabu inhibitornu aktivnost na rast *L. monocytogenes* ATCC 19112.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 12), može se zapaziti da dodatak etarskih ulja mente i timijana u koncentraciji od 0,1% i 0,2%, skraćuje vremenski period koji je potreban da se ostvari potpuna inhibicija bakterijskog soja *L. monocytogenes* ATCC 19112, za 24h, u poređenju sa samim 0,5% hitozanom. Najizraženiju antimikrobnu aktivnost ispoljio je 0,5% film hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana. Sa ovom formulacijom filma, u poređenju sa kontrolom (rotkva) postiže se smanjenje prosečnog broja bakterija od 1,3 log<sub>10</sub> CFU/g za 24 h odnosno 2,4 log<sub>10</sub> CFU/g za 48 h skladištenja.

Vrednost korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na crnoj rotkvi u prisustvu 0,5% kompozitnog filma hitozana ( $r = 0.98$ ), ukazuje da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

#### **5.4.2. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na rotkvi u prisustvu 1% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma od 1% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 18 (Grafik 13).

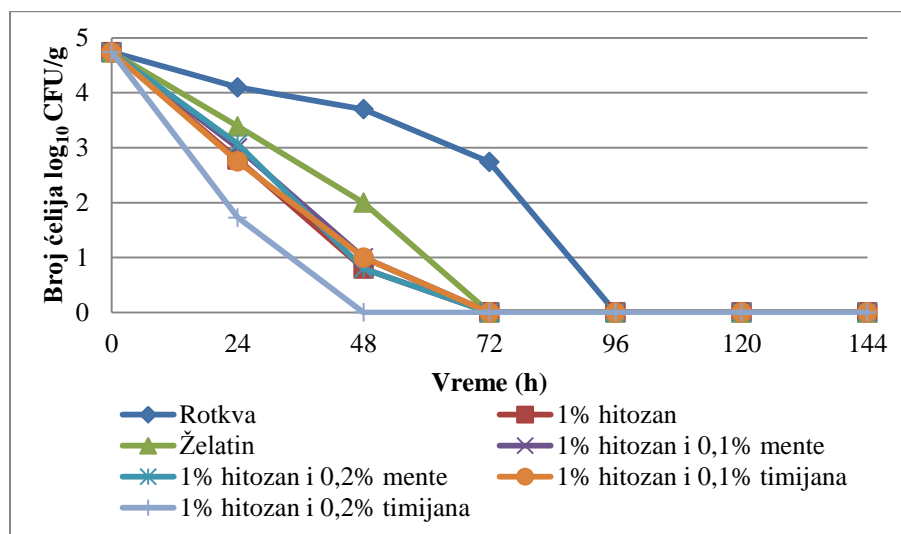
Na početku ispitivanja nije uočena statistički značajna razlika između prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u svim ispitivanim uzorcima. Nakon 24h skladištenja, prosečan broj bakterija u rotkvi bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog ukupnog broja bakterija u uzorcima koji su tretirani 1% filmom hitozana kao i u uzorcima koji su tretirani filmom 1% hitozana sa dodatkom etarskih ulja. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana, na nivou značajnosti  $p < 0,05$ . Nije utvrđena statistički značajna razlika u broju *L. monocytogenes* ATCC 19115 između uzoraka 1% hitozana i filma hitozana sa dodatkom 0,1% etarskog ulja timijana, za vremenski period od 24h.

**Tabela 18. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj crnoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma 1% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Rotkva	4.74±0.06 <sup>a</sup>	4.10±0.12 <sup>a</sup>	3.70±0.09 <sup>a</sup>	2.74±0.08 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
1% hitozan	4.74±0.06 <sup>a</sup>	2.79±0.08 <sup>b</sup>	0.80±0.70 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kis.	4.74±0.06 <sup>a</sup>	3.39±0.09 <sup>c</sup>	2.00±0.13 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% mente	4.74±0.06 <sup>a</sup>	3.00±0.09 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>b,d</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% mente	4.74±0.06 <sup>a</sup>	3.07±0.10 <sup>d,e</sup>	0.80±0.70 <sup>b,e</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% timijana	4.74±0.06 <sup>a</sup>	2.75±0.13 <sup>b,f</sup>	1.00±0.00 <sup>b,f</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% timijana	4.74±0.06 <sup>a</sup>	1.73±0.20 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Takođe, nije utvrđena ni razlika u broju ispitivanih bakterija između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filma 1% hitozana sa dodatkom različitih koncentracija etarskog ulja mente.



**Grafik 13. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma sa 1% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Nakon 48h skladištenja, utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u prosečnom broju bakterija između svih uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana i uzoraka rotkve (kontrola). Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC

19115 u uzorcima skladištenim u prisustvu želatina bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 13), može se zapaziti da se brojnost populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 veoma brzo smanjuje u uzorku crne rotkve. Tokom skladištenja na 4°C, početni broj bakterija od 4,7 log<sub>10</sub> CFU/g se smanjio do vrednosti koje se nisu mogle detektovati nakon četvrtog dana skladištenja. 1% film hitozana ispoljava snažnu antimikrobnu aktivnost što se može uočiti na osnovu brzog opadanja brojnosti populacije ispitivanih bakterija. Sa sigurnošću od 95%, može se tvrditi da je ostvarena razlika u brojnosti bakterijske populacije između rotkve (kontrola) i svih formulacija kompozitnih filmova hitozana statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Ostvarena razlika između kontrolnog uzorka i uzorka skladištenog u prisustvu 1% hitozana iznosila je 1,3 log<sub>10</sub> CFU/g za 24h odnosno 2,7 log<sub>10</sub> CFU/g za 48h. Razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 između uzoraka skladištenih u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom i 1 % hitozana iznosila je 0,6 log<sub>10</sub> CFU/g za 24h odnosno 1 log<sub>10</sub> CFU/g za 48h. Dodatak etarskog ulja mente u koncentraciji od 0,1% i 0,2% nije značajno povećao antimikrobnu aktivnost 1% filma hitozana. Slični rezultati su dobijeni i sa filmom hitozana sa dodatkom 0,1% etarskog ulja timijana. Najveće smanjenje u brojnosti populacije ispitivanog bakterijskog soja uočeno je kod uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana. Ova formulacija filma omogućila je potpunu inhibiciju bakterijskog soja već nakon 48 h.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma od 1% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 19 (Grafik 14).

Za prvih 24h utvđena je statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 između svih uzoraka koji su tretirani 1% filmovima hitozana i kontrolnog uzorka crne rotkve. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina i sirćetne kiseline bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim u prisustvu 1% hitozana. Nije utvrđena statistički značajna razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 između uzoraka

tretiranih filmom 1% hitozana sa dodatkom 0,1% etarskog ulja mente i filma sa dodatkom 0,2% etarskog ulja mente. Takođe, nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u brojnosti bakterijske populacije između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filmova sa dodatkom 0,2% mente i 0,1% timijana.

**Tabela 19. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj crnoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma 1% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Crna rotkva	4.60±0.06 <sup>a</sup>	3.90±0.05 <sup>a</sup>	3.30±0.09 <sup>a</sup>	2.85±0.09 <sup>a</sup>	1.70±0.10 <sup>a</sup>	ND	ND
1% hitozan	4.60±0.06 <sup>a</sup>	2.60±0.07 <sup>b</sup>	1.70±0.24 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kis.	4.60±0.06 <sup>a</sup>	3.61±0.07 <sup>c</sup>	2.70±0.18 <sup>b,c</sup>	1.60±0.11 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% mente	4.60±0.06 <sup>a</sup>	2.40±0.08 <sup>d</sup>	1.50±0.24 <sup>b,d</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% mente	4.60±0.06 <sup>a</sup>	2.30±0.20 <sup>d,e,f</sup>	1.36±0.10 <sup>b,d,e</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% timijana	4.60±0.06 <sup>a</sup>	2.00±0.15 <sup>e,f</sup>	0.80±0.70 <sup>b,d,e,f</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% timijana	4.60±0.06 <sup>a</sup>	1.75±0.25 <sup>e,f,g</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

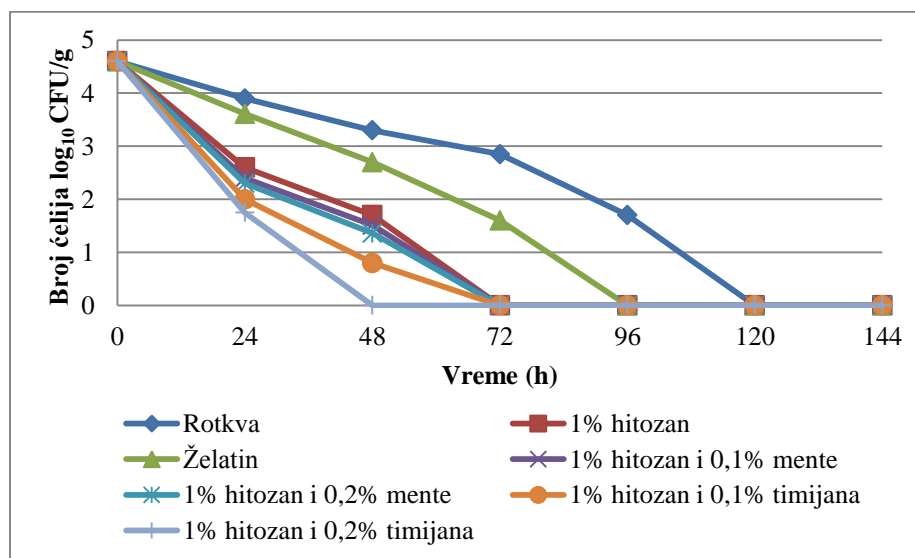
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ), ND – ne može se detektovati.

Za 48 h, prosečan broj bakterija u uzorcima rotkve (kontrola) bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 1% hitozana. Utvrđena je statistički značajna razlika između prosečnog broja bakterija u uzorcima rotkve koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i uzorcima sa želatinom i sirćetnom kiselinom.

Rezultati prikazani na Grafiku 14, pokazuju da 1% film hitozana u poređenju sa rotkvom (kontrola), izaziva smanjenje brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 1,3  $\log_{10}$  CFU/g u vremenu od 24h odnosno 1,6  $\log_{10}$  CFU/g u vremenu od 48h. Razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 između uzoraka skladištenih u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom i 1% hitozana iznosila je 1  $\log_{10}$  CFU/g za 24h. Na osnovu statističke analize može se tvrditi da je dobijena razlika statistički značajna, odnosno da 1% film hitozana ispoljava značajnu antimikrobnu aktivnost prema ispitivanom soju bakterija ( $p < 0,05$ ).

Dodatak etarskih ulja mente i timijana u filmove hitozana značajno povećava njihovu antimikrobnu aktivnost. Najveća inhibicija postignuta je sa 1% filmom hitozana sa dodatkom 0,2% timijana. U poređenju sa samim 1% filmom hitozana, dodatak etarskog ulja timijana skratio je vreme potrebno da se inaktivira soj *L. monocytogenes* ATCC 19112 za 48h.



**Grafik 14. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj rotkvi u prisustvu kompozitnog filma sa 1% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Vrednost korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na crnoj rotkvi u prisustvu 1% kompozitnog filma hitozana ( $r=0.98$ ), ukazuje da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

#### **5.4.3. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na šargarepi u prisustvu 0,5% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma od 0,5% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 20 (Grafik 15).

Prosečan ukupan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorcima šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog ukupnog broja bakterija u uzorcima koji su tretirani filmom 0,5% hitozana ili filmovima hitozana sa dodatkom etarskih ulja, za vremenski period skladištenja od 24h. U ovom period nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnog broja bakterija između uzoraka koji su tretirani filmom hitozana sa dodatkom 0,1% etarskog ulja mente i uzoraka koji su tretirani filmom hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja mente. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim u prisustvu 0,5% hitozana.

Do kraja skladištenja, prosečan ukupan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 bio je statistički značajno različit ( $p < 0,05$ ) od prosečnog ukupnog broja bakterija u svim ispitivanim uzorcima.

**Tabela 20. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Šargarepa	5.00±0.04 <sup>a</sup>	5.10±0.01 <sup>a</sup>	5.00±0.12 <sup>a</sup>	4.40±0.03 <sup>a</sup>	2.50±0.05 <sup>a</sup>	1.40±0.10 <sup>a</sup>	ND
0,5% hitozan	5.00±0.04 <sup>a</sup>	3.60±0.03 <sup>b</sup>	2.80±0.10 <sup>b</sup>	2.00±0.07 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kis.	5.00±0.04 <sup>a</sup>	4.20±0.07 <sup>c</sup>	2.90±0.06 <sup>b,c</sup>	1.20±0.28 <sup>c,e</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% mente	5.00±0.04 <sup>a</sup>	3.40±0.04 <sup>d</sup>	2.60±0.03 <sup>b,d</sup>	1.50±0.07 <sup>d</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% mente	5.00±0.04 <sup>a</sup>	3.10±0.06 <sup>e</sup>	2.30±0.04 <sup>e</sup>	1.20±0.17 <sup>c,e</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% timijana	5.00±0.04 <sup>a</sup>	3.00±0.05 <sup>e,f</sup>	2.10±0.05 <sup>f</sup>	1.00±0.00 <sup>e,f</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% timijana	5.00±0.04 <sup>a</sup>	2.80±0.09 <sup>g</sup>	1.55±0.13 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND

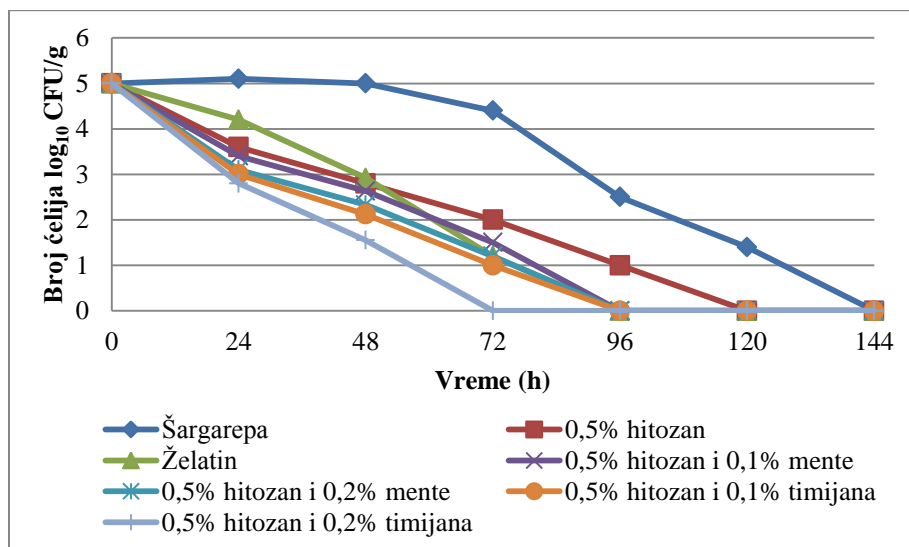
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ), ND – ne može se detektovati.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 15) može se zapaziti da sam 0,5% film hitozana u poređenju sa šargarepom (kontrola), izaziva smanjenje prosečnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 1,7  $\log_{10}$  CFU/g u vremenu od 24h odnosno 2,3  $\log_{10}$  CFU/g u vremenu od 48h. Između kontrolnog uzorka šargarepe i svih ispitivanih formulacija 0,5% filma hitozana utvrđena je statistički značajna razlika u brojnosti populacije *Listeria sp.* ( $p < 0,05$ ). Na osnovu statističke analize može se sa sigurnošću od 95% tvrditi da sve upotrebljene



formulacije 0,5% filmova hitozana ispoljavaju značajnu antimikrobnu aktivnost prema ispitivanom soju bakterija.



**Grafik 15. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma sa 0,5% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Potpuna inhibicija ispitivane bakterijske vrste sa 0,5% filmom hitozana u uzorcima šargarepe ostvarena je nakon 120 h. Razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 između uzoraka šargarepe skladištenih u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom i 0,5% filma hitozana iznosila je 0,6 log<sub>10</sub> CFU/g za 24h, odnosno 0,3 log<sub>10</sub> CFU/g za 48h. Najsnažniju antimikrobnu aktivnost ispoljio je 0,5% film hitozana sa dodatkom 0,2% etarkog ulja timijana. Ova formulacija filma hitozana omogućila je potpunu inaktivaciju bakterijskog soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 za 72h.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 21 (Grafik 16).

Za period od 24h, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima sveže sečene šargarepe, bio je veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 0,5% filma hitozana kao i u uzorcima hitozana sa dodatkom etarskih ulja. Utvrđena je statistički značajna razlika u broju bakterija između uzoraka 0,5%

hitozana i uzoraka skladištenih u prisustvu želatina. Utvrđeno je da dodatak svih ispitivanih koncentracija etarskih ulja povećava antimikrobnu aktivnost 0,5% filma hitozana.

**Tabela 21. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (log <sub>10</sub> CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Šargarepa	5.10±0.04 <sup>a</sup>	5.20±0.03 <sup>a</sup>	5.40±0.03 <sup>a</sup>	5.50±0.03 <sup>a</sup>	5.00±0.03 <sup>a</sup>	1.40±0.10 <sup>a</sup>	2.50±0.20 <sup>a</sup>
0,5% hitozan	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.60±0.03 <sup>b</sup>	2.70±0.09 <sup>b</sup>	2.00±0.09 <sup>b</sup>	1.50±0.15 <sup>b</sup>	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	5.10±0.04 <sup>a</sup>	4.50±0.04 <sup>c</sup>	3.70±0.03 <sup>b,c</sup>	2.70±0.09 <sup>c,e</sup>	1.20±0.17 <sup>b,c</sup>	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% mente	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.50±0.03 <sup>d</sup>	2.50±0.07 <sup>b,d</sup>	1.60±0.11 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% mente	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.40±0.03 <sup>e</sup>	2.10±0.09 <sup>e</sup>	1.00±0.00 <sup>e</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% timijana	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.00±0.07 <sup>e,f</sup>	1.90±0.09 <sup>f</sup>	0.80±0.00 <sup>e,f</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% timijana	5.10±0.04 <sup>a</sup>	2.80±0.01 <sup>g</sup>	1.00±0.00 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

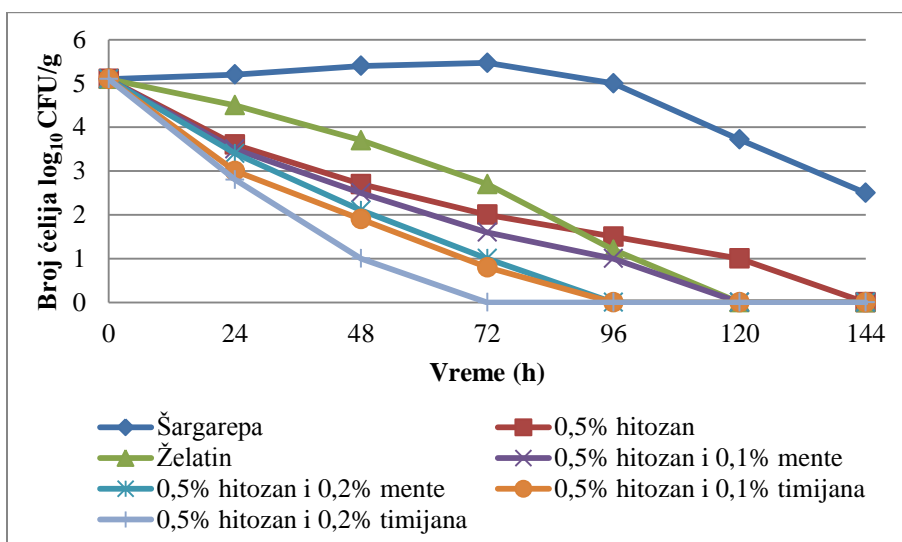
Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Za 48h skladištenja, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 0,5% hitozana. Utvrđena je statistički značajna razlika između uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana i uzoraka koji su skladišteni u prisustvu želatina, kao i uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana sa dodatkom etarskih ulja. Nije utvrđena razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka koji su skladišteni sa filmom hitozana uz dodatak 0,1% i 0,2% etarskog ulja mente.

Za 72h prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 0,5% hitozana.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 16), može se zaključiti da primena 0,5% filma hitozana značajno utiče na smanjenje brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 u poređenju sa uzorcima šargarepe (kontrola), tokom celog perioda ispitivanja. Uzorci koji

su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana i u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom, statistički se značajno razlikuju za vremenski period od prvih 72h.



**Grafik 16. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma sa 0,5% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Potpuna inhibicija bakterijskog soja, u prisustvu 0,5% hitozana ostvarena je za 144h. Dodatak etarskih ulja u film hitozana uticao je na povećanje njegove antimikrobne aktivnosti. Pri tom, ne postoji statistički značajna razlika između filmova sa dodatkom 0,2% etarskog ulja mente i 0,1% etarskog ulja timijana, nakon 48h i 72h. Sa ovim formulacijama filma hitozana ostvarena je potpuna inhibicija soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 za period od 96h. Najefikasnije antimikrobno dejstvo imao je film hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana, kod koga je potpuna inhibicija bakterija ostvarena za period od 72h.

Vrednosti korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na šargarepi u prisustvu 0,5% kompozitnog filma hitozana ( $r=0,98$ ), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

#### 5.4.4. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na šargarepi u prisustvu 1% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma od 1% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 22 (Grafik 17).

**Tabela 22. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma 1% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 (log <sub>10</sub> CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Šargarepa	4.90±0.02 <sup>a</sup>	5.02±0.04 <sup>a</sup>	4.87±0.03 <sup>a</sup>	4.25±0.08 <sup>a</sup>	2.60±0.04 <sup>a</sup>	1.30±0.24 <sup>a</sup>	ND
1% hitozan	4.90±0.02 <sup>a</sup>	2.50±0.02 <sup>b</sup>	1.82±0.03 <sup>b</sup>	1.20±0.17 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	4.90±0.02 <sup>a</sup>	4.00±0.09 <sup>c</sup>	2.60±0.04 <sup>c</sup>	0.80±0.70 <sup>b,c</sup>	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% mente	4.90±0.02 <sup>a</sup>	2.30±0.05 <sup>d</sup>	1.50±0.10 <sup>d</sup>	1.10±0.17 <sup>d,b</sup>	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% mente	4.90±0.02 <sup>a</sup>	2.20±0.05 <sup>d,e</sup>	1.00±0.00 <sup>d,e</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% timijana	4.90±0.02 <sup>a</sup>	2.00±0.05 <sup>f</sup>	0.80±0.70 <sup>d,e,f</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% timijana	4.90±0.02 <sup>a</sup>	2.00±0.02 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

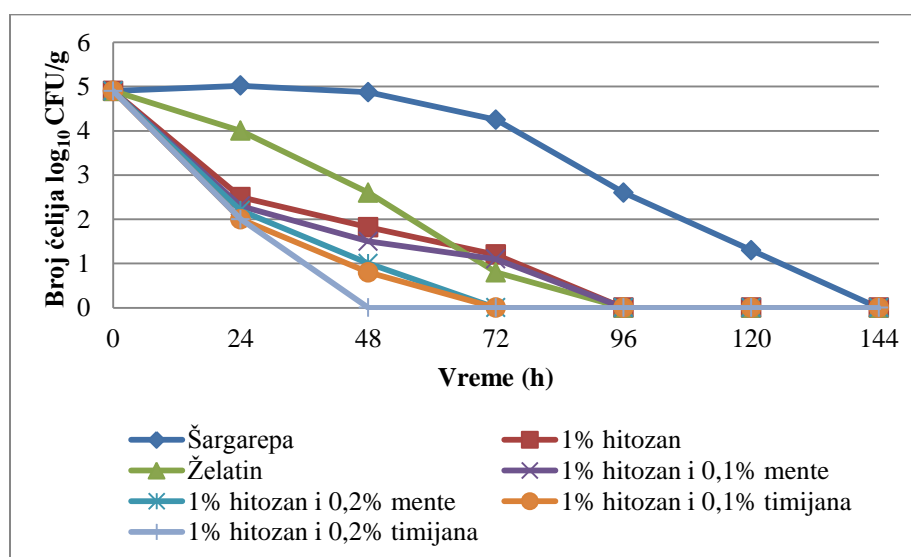
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 1% hitozana za prvih 24h skladištenja. Za ovaj period ispitivanja nije utvrđena statistički značajna razlika između upotrebljenih koncentracija etarskih ulja od 0,1% i 0,2% mente kao ni između 0,1% i 0,2% timijana. Prosečan broj bakterija u uzorcima šargarepe koji su skladišteni u prisustvu želatina bio je značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim sa 1% hitozanom.

Za vreme od 48h, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 1% hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima šargarepe koji su skladišteni u prisustvu želatina bio je značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim sa 1% hitozanom. Nije utvrđena statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka

skladištenih u prisustvu filmova hitozana koji su pripremljeni sa dodatkom 0,1% etarskog ulja mente i 0,2% mente kao ni između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana sa dodatkom 0,1% mente i 0,1% timijana.

Za 72h skladištenja, utvrđena je statistički značajna razlika u broju bakterija između uzoraka šargarepe i svih uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana. Nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između uzoraka koji su bili skladišteni u prisustvu 1% hitozana i želatina kao ni između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i filma sa dodatkom 0,1% etarskog ulja mente.



**Grafik 17. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma sa 1% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 17), može se uočiti da sve upotrebljene formulacije 1% hitozana značajno doprinose smanjenju brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u šargarepi. Sam 1% film hitozana, ostvario je smanjenje broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u poređenju sa kontrolom (šargarepa) od 2,7  $\log_{10}$  CFU/g za 24h odnosno 3  $\log_{10}$  CFU/g za 48h. Iz prikazanih rezultata (Grafik 17), može se videti da i film želatina pripremljen sa 1% sirćetnom kiselinom značajno doprinosi smanjenju brojnosti *Listeria sp.* u šargarepi. Razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 između uzoraka šargarepe skladištenih u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom i 1% hitozana iznosila je 1,7  $\log_{10}$  CFU/g za 24h, odnosno 0,8  $\log_{10}$

CFU/g za 48h. Na osnovu dobijenih rezultata može se zapaziti da 1% hitozan ispoljava inhibitornu aktivnost na rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 u toku prvih 72h. Dodatkom etarskih ulja filmu hitozana, omogućeno je brže i efikasnije odumiranje ispitivanog bakterijskog soja. Najsnažnije antimikrobno dejstvo ispoljio je 1% film hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana kod koga je potpuna inhibicija ispitivanog bakterijskog soja postignuta za 48h.

Rezultati ispitivanja rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma od 1% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 23 (Grafik 18).

**Tabela 23. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma 1% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Šargarepa	5.37±0.03 <sup>a</sup>	5.50±0.04 <sup>a</sup>	5.60±0.02 <sup>a</sup>	5.50±0.05 <sup>a</sup>	5.20±0.05 <sup>a</sup>	4.00±0.02 <sup>a</sup>	2.86±0.03 <sup>a</sup>
1% hitozan	5.37±0.03 <sup>a</sup>	3.30±0.07 <sup>b</sup>	2.10±0.07 <sup>b</sup>	1.50±0.07 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	5.37±0.03 <sup>a</sup>	4.60±0.04 <sup>c</sup>	4.00±0.09 <sup>c</sup>	2.90±0.01 <sup>c</sup>	1.50 <sup>c</sup> ±0.07	ND	ND
1% hitozan i 0,1% mente	5.37±0.03 <sup>a</sup>	3.37±0.01 <sup>b,d</sup>	2.70±0.01 <sup>d</sup>	2.10±0.02 <sup>d</sup>	1.46±0.15 <sup>b,d</sup>	ND	ND
1% hitozan i 0,2% mente	5.37±0.03 <sup>a</sup>	3.42±0.03 <sup>e</sup>	2.05±0.06 <sup>b,e</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% timijana	5.37±0.03 <sup>a</sup>	3.00±0.10 <sup>f</sup>	1.36±0.10 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% timijana	5.37±0.03 <sup>a</sup>	2.50±0.05 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

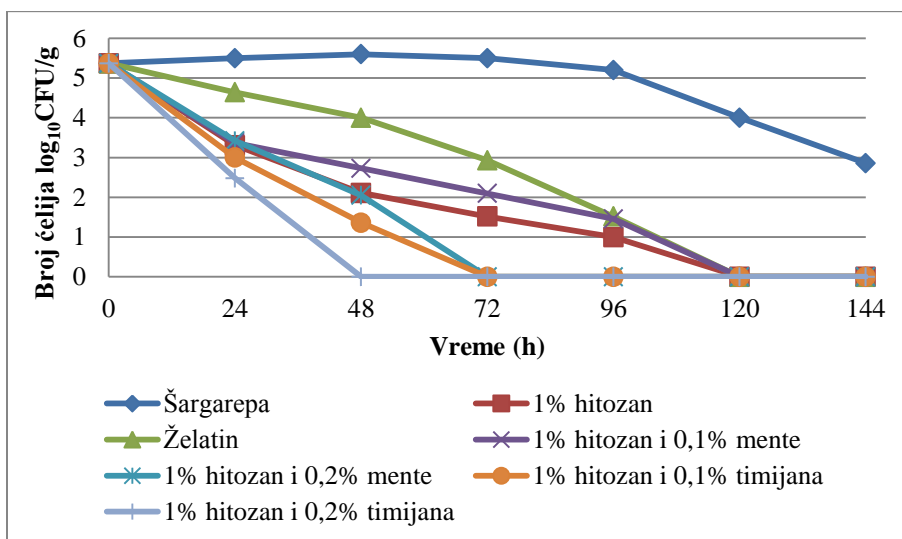
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Za period od 24h, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima sveže sečene šargarepe, bio je veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 1% filma hitozana kao i u uzorcima hitozana sa dodatkom etarskih ulja. Utvrđena je statistički značajna razlika u broju bakterija između uzoraka 1% hitozana i uzoraka skladištenih u prisustvu želatina. Utvrđeno je da dodatak 0,1% etarskog ulja mente nije statistički značajno povećao antimikrobnu aktivnost 1% filma hitozana.

Za 48h skladištenja, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p < 0.05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 1% hitozana.

Utvrđena je statistički značajna razlika između uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i uzoraka koji su skladišteni u prisustvu želatina.

Za 72h skladištenja, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filмова 1% hitozana. Utvrđena je statistički značajna razlika između uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i uzoraka koji su skladišteni u prisustvu želatina.



**Grafik 18. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma sa 1% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Za 96h utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija između kontrolnog uzorka šargarepe i svih uzoraka koji su skladišteni u prisustvu hitozana, kao i između uzoraka 1% hitozana i želatina. Prosečan broj bakterija u uzorcima skladištenim u prisustvu filma sa dodatkom 0,1% mente i filma sa dodatkom 0,2% mente nije se statistički značajno razlikovao.

Primenom 1% filma hitozana (Grafik 18), ostvarena je značajna inhibicija bakterijskog soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 u poređenju sa šargarepom (kontrola), tokom celog perioda ispitivanja. Potpuna inhibicija ispitivanog bakterijskog soja u prisustvu 1% hitozana ostvarena je za period od 120h. Dodatak etarskog ulja mente u koncentraciji od 0,2% i etarskog ulja timijana u koncentracijama od 0,1% i 0,2% uticao je

značajno na povećanje antimikrobne aktivnosti filma hitozana. Primenom filma hitozana sa dodatkom 0,1% etarskog ulja timijana, kao i filma sa dodatkom 0,2% etarskog ulja mente, postignuta je potpuna inhibicija početnog broja bakterija u vremenskom period od 72 h. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dodatak ovih koncentracija etarskih ulja, može značajno skratiti period koji je potreban da se u potpunosti inhibira ispitivani soj bakterija pomoću 1% filma hitozana. Najveću antimikrobnu aktivnost ispoljio je 1% film hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana. Sa ovom formulacijom filma postiže se potpuna inhibicija bakterija za vreme od 48h.

Vrednosti korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na šargarepi u prisustvu 1% kompozitnog filma hitozana ( $r=0.98$ ), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

#### **5.4.5. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na šargarepi u prisustvu 2% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma od 2% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 24 (Grafik 19).

Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p<0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 2% hitozana za prvih 24h skladištenja. Za ovaj period ispitivanja prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 2% filma hitozana bio je manji od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu samog želatina mada između njih nije utvrđena statistički značajna razlika.

Za 48h skladištenja, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorcima sveže sečene šargarepe bio je statistički značajno veći ( $p<0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 2% hitozana.

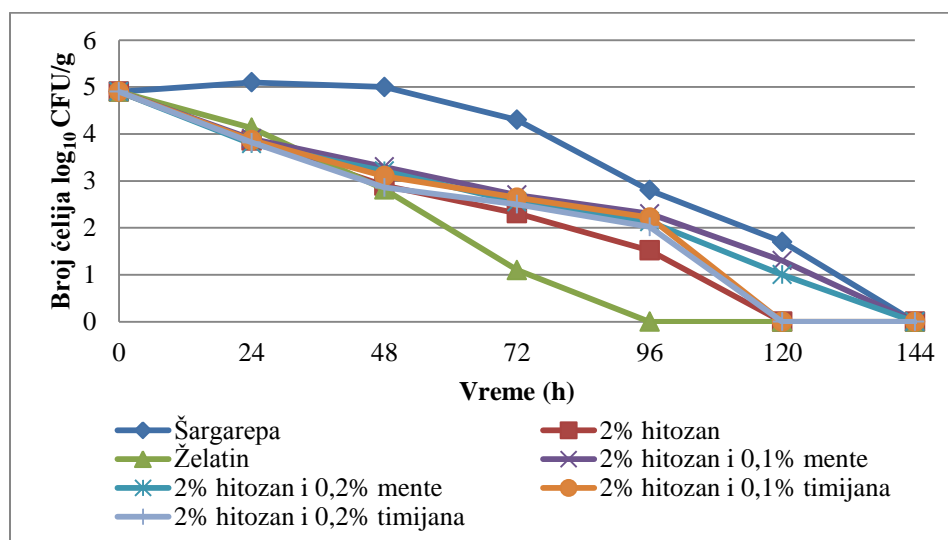


**Tabela 24. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma 2% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Šargarepa	4.90±0.02 <sup>a</sup>	5.10±0.03 <sup>a</sup>	5.00±0.02 <sup>a</sup>	4.30±0.05 <sup>a</sup>	2.80±0.03 <sup>a</sup>	1.70±0.09 <sup>a</sup>	ND
2% hitozan	4.90±0.02 <sup>a</sup>	3.90±0.03 <sup>b</sup>	2.90±0.01 <sup>b</sup>	2.30±0.04 <sup>b</sup>	1.50±0.07 <sup>b</sup>	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	4.90±0.02 <sup>a</sup>	4.10±0.10 <sup>b,c</sup>	2.80±0.03 <sup>c</sup>	1.10±0.17 <sup>c</sup>	ND	ND	ND
2% hitozan i 0,1% mente	4.90±0.02 <sup>a</sup>	3.90±0.06 <sup>b,d</sup>	3.30±0.06 <sup>d</sup>	2.70±0.02 <sup>d</sup>	2.30±0.05 <sup>c</sup>	1.30±0.24 <sup>b</sup>	ND
2% hitozan i 0,2% mente	4.90±0.02 <sup>a</sup>	3.80±0.03 <sup>e</sup>	3.20±0.05 <sup>d,e,f</sup>	2.55±0.06 <sup>e</sup>	2.10±0.10 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	ND
2% hitozan i 0,1% timijana	4.90±0.02 <sup>a</sup>	3.90±0.03 <sup>b,d,f</sup>	3.10±0.07 <sup>b,c,f</sup>	2.60±0.02 <sup>f</sup>	2.20±0.05 <sup>c,d,e</sup>	ND	ND
2% hitozan i 0,2% timijana	4.90±0.02 <sup>a</sup>	3.80±0.05 <sup>b,d,e,f,g</sup>	2.90±0.02 <sup>b</sup>	2.50±0.05 <sup>e,g</sup>	2.00±0.07 <sup>f,d</sup>	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ). ND – ne može se detektovati.

Nakon 72h, između kontrolnog uzorka šargarepe i svih uzoraka skladištenih u prisustvu 2% filma hitozana utvrđena je statistički značajna razlika.



**Grafik 19. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma sa 2% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 19), može se uočiti da sve upotrebljene formulacije filmova 2% hitozana značajno doprinose smanjenju broja *L. monocytogenes*

ATCC 19115 u šargarepi. Međutim, razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 između uzoraka šargarepe skladištenih u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom i 2% hitozana za prvih 24h iznosila je svega 0,3 log<sub>10</sub> CFU/g, i nije bila statistički značajna. Sa produžetkom skladištenja, smanjenje prosečnog broja bakterija u uzorcima želatina koji su pripremljeni sa sirćetnom kiselinom bilo je vreće od smanjenja prosečnog broja bakterija u uzorcima skladištenim u prisustvu 2% hitozana.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma od 2% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 25 (Grafik 20).

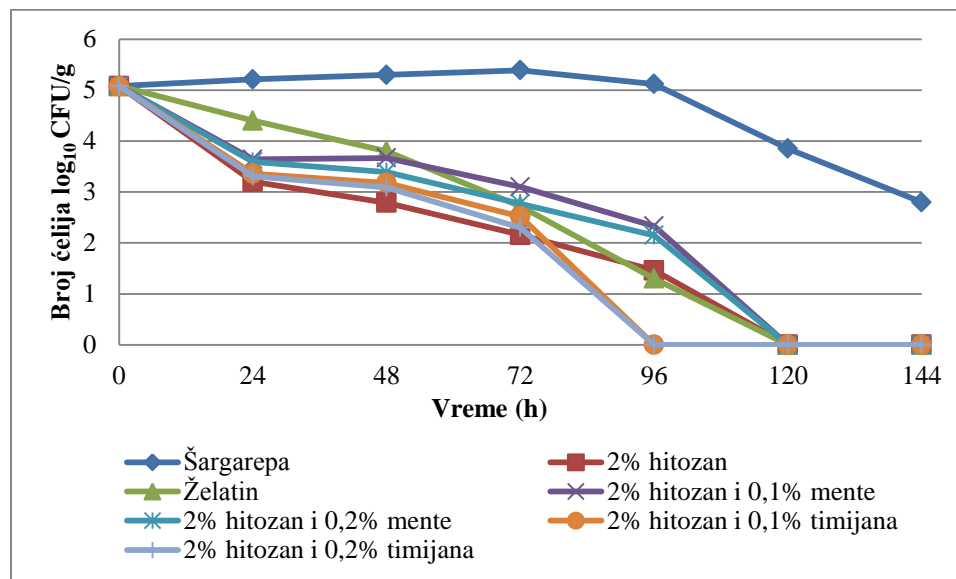
**Tabela 25. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma 2% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (log <sub>10</sub> CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Šargarepa	5.10±0.04 <sup>a</sup>	5.20±0.04 <sup>a</sup>	5.30±0.06 <sup>a</sup>	5.40±0.03 <sup>a</sup>	5.10±0.05 <sup>a</sup>	3.85±0.01 <sup>a</sup>	2.80±0.02 <sup>a</sup>
2% hitozan	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.20±0.09 <sup>b</sup>	2.80±0.02 <sup>b</sup>	2.16±0.06 <sup>b</sup>	1.50±0.15 <sup>b</sup>	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	5.10±0.04 <sup>a</sup>	4.40±0.03 <sup>c</sup>	3.80±0.02 <sup>c</sup>	2.70±0.03 <sup>c</sup>	1.30±0.24 <sup>b,c</sup>	ND	ND
2% hitozan i 0,1% mente	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.64±0.04 <sup>d</sup>	3.70±0.03 <sup>d</sup>	3.10±0.05 <sup>d</sup>	2.30±0.03 <sup>d</sup>	ND	ND
2% hitozan i 0,2% mente	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.60±0.02 <sup>d,e</sup>	3.40±0.04 <sup>e</sup>	2.77±0.07 <sup>e</sup>	2.15±0.04 <sup>e</sup>	ND	ND
2% hitozan i 0,1% timijana	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.36±0.05 <sup>f</sup>	3.20±0.09 <sup>f</sup>	2.50±0.03 <sup>f</sup>	ND	ND	ND
2% hitozan i 0,2% timijana	5.10±0.04 <sup>a</sup>	3.30±0.01 <sup>f,g</sup>	3.10±0.09 <sup>b,f,g</sup>	2.30±0.06 <sup>g</sup>	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Nakon 96h skladištenja, nije utvrđena statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka želatina i 2% hitozana.

Potpuna inhibicija *L. monocytogenes* ATCC 19112, u prisustvu 2% hitozana ostvarena je za 120h (Grafik 20). Dodatak etarskih ulja u film hitozana uticao je na povećanje njegove antimikrobne aktivnosti. Pri tom, sa dodatkom 0,1% i 0,2% etarskog ulja timijana, ostvarena je potpuna inhibicija ispitivanog bakterijskog soja za vreme od 96h.



**Grafik 20. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sečenoj šargarepi u prisustvu kompozitnog filma sa 2% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Vrednosti korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na šargarepi u prisustvu 2% kompozitnog filma hitozana ( $r=0.98$ ), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

#### 5.4.6. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na kupusu u prisustvu 0,5% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja

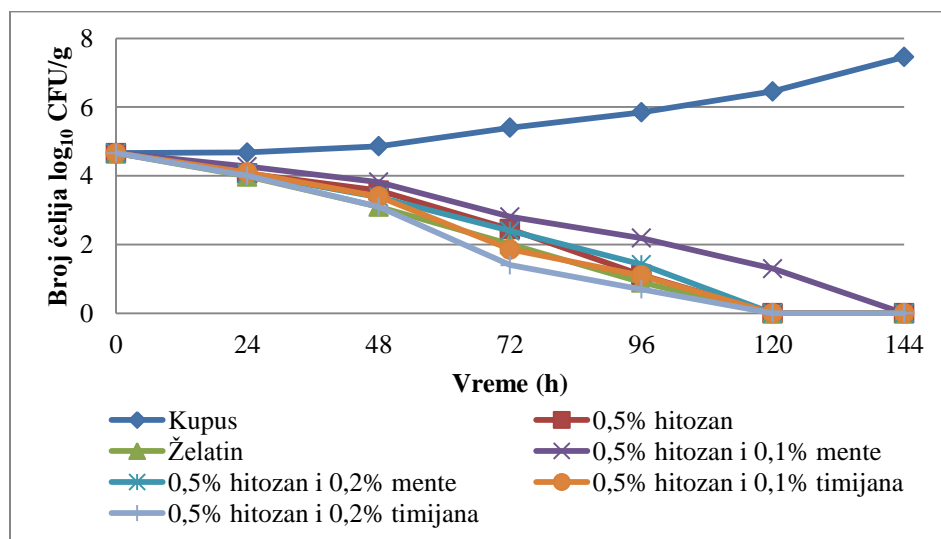
Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma od 0,5% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 26 (Grafik 21).

Nakon 24h skladištenja, utvrđena je statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) u prosečnom broju bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 između kontrolnog uzorka kupusa i svih uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana bio je statistički značajno veći ( $p<0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom. Ovakav trend je uočen tokom celog perioda ispitivanja (144h).

**Tabela 26. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	4.66±0.03 <sup>a</sup>	4.70±0.02 <sup>a</sup>	4.90±0.02 <sup>a</sup>	5.40±0.03 <sup>a</sup>	5.85±0.02 <sup>a</sup>	6.47±0.03 <sup>a</sup>	7.46±0.06 <sup>a</sup>
0,5% hitozan	4.66±0.03 <sup>a</sup>	4.10±0.01 <sup>b</sup>	3.60±0.03 <sup>b</sup>	2.45±0.03 <sup>b</sup>	1.12±0.17 <sup>b</sup>	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	4.66±0.03 <sup>a</sup>	3.98±0.02 <sup>c</sup>	3.10±0.07 <sup>c</sup>	2.00±0.02 <sup>c</sup>	0.90±0.80 <sup>b,c</sup>	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% mente	4.66±0.03 <sup>a</sup>	4.27±0.01 <sup>d</sup>	3.80±0.02 <sup>d</sup>	2.81±0.02 <sup>d</sup>	2.20±0.11 <sup>d</sup>	1.30±0.24 <sup>c</sup>	ND
0,5% hitozan i 0,2% mente	4.66±0.03 <sup>a</sup>	4.10±0.06 <sup>b,e</sup>	3.40±0.09 <sup>e</sup>	2.40±0.05 <sup>b,e</sup>	1.40±0.10 <sup>e</sup>	ND	ND
0,5% hitozan i 0,1% timijana	4.66±0.03 <sup>a</sup>	4.10±0.02 <sup>b,e,f</sup>	3.40±0.05 <sup>f,e</sup>	1.86±0.09 <sup>f,b</sup>	1.10±0.17 <sup>f</sup>	ND	ND
0,5% hitozan i 0,2% timijana	4.66±0.03 <sup>a</sup>	4.00±0.02 <sup>c,g</sup>	3.10±0.12 <sup>c,g</sup>	1.40±0.17 <sup>b,f,g</sup>	0.70±0.60 <sup>g</sup>	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.



**Grafik 21. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma sa 0,5% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Početni broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu povećan je za 2,8  $\log_{10}$  CFU/g u toku 6 dana skladištenja, na temperaturi od 4°C (Grafik 21). U uzorcima kupusa koji su skladišteni u prisustvu 0,5% filma hitozana uočeno je smanjenje brojnosti

populacije ispitivanih bakterija. Razlika veća od 1 log<sub>10</sub> CFU/g između kontrolnog uzorka kupusa i uzorka koji je skladišten u prisustvu filma 0,5% hitozana ostvarena je nakon 48h. Potpuna inhibicija ispitivanog soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u prisustvu filma hitozana je postignuta nakon 120h skladištenja.

Međutim, iz prikazanih rezultata (Grafik 21) može se uočiti da je antimikrobna aktivnost želatina pripremljenog sa sirćetnom kiselinom statistički značajno veća (p<0,05) od antimikrobne aktivnosti filma 0,5% hitozana. Dodatak etarskih ulja timijana i mente povećava antimikrobnu aktivnost filma hitozana. Najveću antimikrobnu aktivnost ispoljio je film 0,5% hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana. Ova formulacija filma hitozana omogućila je smanjenje početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 1,5 log<sub>10</sub> CFU/g za 48 h skladištenja, odnosno smanjenje od 3,2 log<sub>10</sub> CFU/g za period od 72h na temperaturi od 4°C. Početni broj ispitivanog bakterijskog soja od 4,6 log<sub>10</sub> CFU/g, smanjen je do nivoa koji se nisu mogli detektovati za period skladištenja od 120h.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma od 0,5% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 27 (Grafik 22).

**Tabela 27. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma 0,5% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (log <sub>10</sub> CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	5.40±0.02 <sup>a</sup>	5.67±0.04 <sup>a</sup>	6.10±0.02 <sup>a</sup>	6.38±0.03 <sup>a</sup>	7.20±0.02 <sup>a</sup>	8.30±0.02 <sup>a</sup>	8.61±0.04 <sup>a</sup>
0,5% hitozan	5.40±0.02 <sup>a</sup>	4.40±0.09 <sup>b</sup>	4.20±0.02 <sup>b</sup>	3.20±0.04 <sup>b</sup>	2.90±0.02 <sup>b</sup>	2.00±0.11 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	5.40±0.02 <sup>a</sup>	4.60±0.05 <sup>c,b</sup>	4.00±0.02 <sup>c</sup>	3.00±0.12 <sup>c</sup>	2.30±0.04 <sup>c</sup>	1.40±0.10 <sup>c</sup>	ND
0,5% hitozan i 0,1% mente	5.40±0.02 <sup>a</sup>	4.50±0.04 <sup>b,d</sup>	3.80±0.02 <sup>d</sup>	2.90±0.02 <sup>d</sup>	2.40±0.03 <sup>d</sup>	0.80±0.70 <sup>d</sup>	ND
0,5% hitozan i 0,2% mente	5.40±0.02 <sup>a</sup>	4.30±0.07 <sup>b,e</sup>	3.40±0.08 <sup>e</sup>	2.50±0.04 <sup>e</sup>	2.30±0.05 <sup>e</sup>	1.00±0.00 <sup>d,e</sup>	ND
0,5% hitozan i 0,1% timijana	5.40±0.02 <sup>a</sup>	4.30±0.05 <sup>b,e,f</sup>	3.50±0.05 <sup>e,f</sup>	2.40±0.05 <sup>f</sup>	2.10±0.08 <sup>f</sup>	1.10±0.17 <sup>d,e,f</sup>	ND
0,5% hitozan i 0,2% timijana	5.40±0.02 <sup>a</sup>	3.67±0.03 <sup>g</sup>	3.09±0.06 <sup>g</sup>	2.20±0.13 <sup>f,g</sup>	1.82±0.03 <sup>g</sup>	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

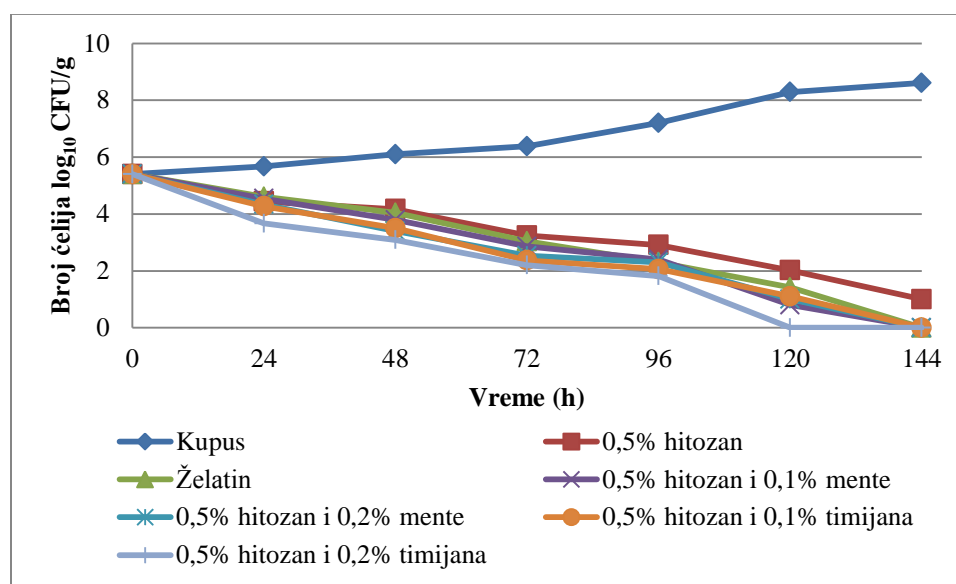
Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju (p < 0.05), ND – ne može se detektovati.

Na početku ispitivanja nije utvrđena statistički značajna razlika (p<0,05) između prosečnog broja bakterija u uzorcima kupusa i uzoraka koji su tretirani hitozanom. Nakon

24h skladištenja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između prosečnog broja bakterija u uzorcima rotkve i prosečnog broja bakterija u svim upotrebljenim formulacijama filma hitozana.

U vremenskom periodu od 24h nije utvrđena statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka rotkve koji su tretirani 0,5% hitozanom i uzoraka koji su tretirani filmom želatina koji je pripremljen sa 1% sirćetnom kiselinom. Takođe nije utvrđena statistički značajna razlika, na nivou  $p < 0,05$ , između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 0,5 % hitozana i uzoraka sa dodatkom 0,1% i 0,2% etarskog ulja mente ili 0,2% etarskog ulja timijana.

Nakon 48h ispitivanja, utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija u uzorcima kupusa i svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova sa hitozanom. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom bio je značajno manji od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana. Za vremenski period od 48h nije utvrđena statistički značajna razlika između upotrebljenih koncentracija etarskih ulja koje su primenjene u filmovima hitozana od 0,2% mente i 0,1% timijana.



**Grafik 22. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma sa 0,5% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Nakon 72h ispitivanja, utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija u uzorcima kupusa i svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom bio je značajno manji ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana. Za vremenski period od 72h nije utvrđena statistički značajna razlika između upotrebljenih koncentracija etarskih ulja koje su primenjene u filmovima hitozana od 0,1% i 0,2% timijana.

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 22), može se uočiti da je u toku ispitivanja od 6 dana, početni broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u kupusu uvećan za  $3,2 \log_{10}$  CFU/g. Dobijeni rezultati ukazuju na to da kupus predstavlja povoljan supstrat za rast i razviće ovog bakterijskog soja na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Upotrebljena koncentracija hitozana od 0,5% omogućila je da se početni broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 od  $5,4 \log_{10}$  CFU/g smanji za  $1,2 \log_{10}$  CFU/g za vreme od 48h, odnosno za  $2,2 \log_{10}$  CFU/g za 72h.

Između uzoraka skladištenih u prisustvu hitozana i uzoraka skladištenih u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom, utvrđena je statistički značajna razlika tokom celog perioda ispitivanja, na nivou  $p < 0,05$ . Dobijeni rezultati pokazuju da je prosečan broj bakterija u uzorcima 0,5% hitozana bio statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom, tokom celog perioda ispitivanja.

Dodatak etarskih ulja nakon 48h omogućio je veću antimikrobnu aktivnost 0,5 % hitozana. Potpuna inhibicija početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 postignuta je nakon 120h skladištenja i to sa filmom 0,5% hitozana sa dodatkom etarskog ulja timijana u koncentraciji od 0,2% (Grafik 22).

Vrednosti korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na kupusu u prisustvu 0,5% kompozitnog filma hitozana ( $r=0,96$ ), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

#### 5.4.7. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na kupusu u prisustvu 1% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma od 1% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 28 (Grafik 23).

Za 24h skladištenja, utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 između kontrolnog uzorka kupusa i svih uzoraka koji su tretirani filmom 1% hitozana. Takođe je utvrđena statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka 1% hitozana i želatina. Prosečan broj bakterija između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filma hitozana sa dodatkom 0,1% mente i 0,1% timijana nije se statistički značajno razlikovao na nivou  $p < 0,05$ .

Za 48h prosečan broj bakterija u uzorcima kupusa bio je značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana. Za ovaj period skladištenja utvrđena je statistički značajna razlika u broju bakterija između uzoraka želatina i hitozana. Prosečan broj bakterija između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filma hitozana sa dodatkom 0,2% mente i 0,1% timijana nije se statistički značajno razlikovao na nivou  $p < 0,05$ .

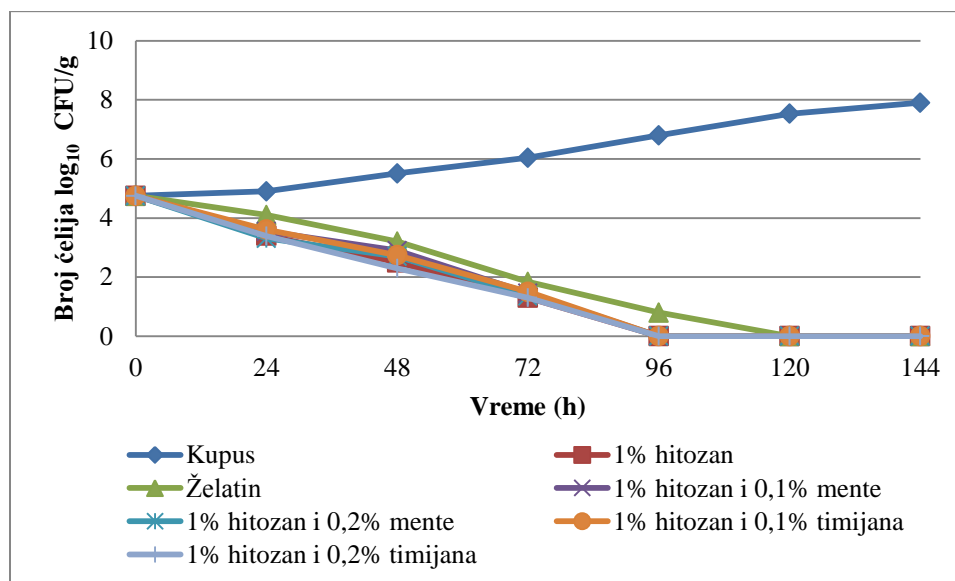
**Tabela 28. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma 1% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	4.75±0.02 <sup>a</sup>	4.90±0.03 <sup>a</sup>	5.50±0.09 <sup>a</sup>	6.00±0.05 <sup>a</sup>	6.80±0.01 <sup>a</sup>	7.50±0.06 <sup>a</sup>	7.90±0.01 <sup>a</sup>
1% hitozan	4.75±0.02 <sup>a</sup>	3.40±0.05 <sup>b</sup>	2.50±0.10 <sup>b</sup>	1.30±0.24 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kis.	4.75±0.02 <sup>a</sup>	4.10±0.09 <sup>c</sup>	3.20±0.14 <sup>c</sup>	1.80±0.06 <sup>c</sup>	0.80±0.70 <sup>c</sup>	ND	ND
1% hitozan i 0,1% mente	4.75±0.02 <sup>a</sup>	3.60±0.05 <sup>d</sup>	2.90±0.05 <sup>d</sup>	1.50±0.15 <sup>b,d</sup>	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% mente	4.75±0.02 <sup>a</sup>	3.30±0.14 <sup>b,e</sup>	2.70±0.08 <sup>e</sup>	1.40±0.10 <sup>b,d,e</sup>	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,1% timijana	4.75±0.02 <sup>a</sup>	3.60±0.09 <sup>f,d</sup>	2.74±0.04 <sup>e,f</sup>	1.50±0.17 <sup>b,d,e,f</sup>	ND	ND	ND
1% hitozan i 0,2% timijana	4.75±0.02 <sup>a</sup>	3.40±0.08 <sup>g,b,e</sup>	2.30±0.11 <sup>b,g</sup>	1.30±0.24 <sup>b,d,e,f,g</sup>	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.



Za 72h skladištenja, prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u uzorcima sveže sečenog kupusa bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u svim uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova 1% hitozana. Utvrđena je statistički značajna razlika između uzoraka kupusa koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i uzoraka koji su skladišteni u prisustvu želatina. Nakon 72h utvrđeno je da dodatak etarskih ulja nije statistički značajno uticao na povećanje antimikrobne aktivnosti 1% filma hitozana.



**Grafik 23. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma sa 1% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 23) može se zapaziti da se početni broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 od  $4,7 \log_{10}$  CFU/g u prisustvu filma 1% hitozana smanjuje za  $1,3 \log_{10}$  CFU/g u toku prvih 24 h skladištenja. U poređenju sa kontrolnim uzorkom kupusa koji je skladišten bez prisustva hitozana, ostvarene vrednosti inhibicije su iznosile  $1,5 \log_{10}$  CFU/g za 24h,  $3 \log_{10}$  CFU/g za 48h odnosno  $4,7 \log_{10}$  CFU/g za 72h. Ova formulacija filma hitozana u potpunosti je inhibirala soj *L. monocytogenes* ATCC 19115 nakon 96h skladištenja kupusa, na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Između kontrolnog uzorka (kupus) i uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 1% filma hitozana utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ). Takođe je utvrđena statistički značajna razlika između uzoraka

skladištenih u prisustvu hitozana i uzoraka skladištenih u prisustvu želatina, tokom celog perioda ispitivanja ( $p < 0,05$ ). Dodatak etarskog ulja mente u koncentracijama od 0,1% i 0,2% i etarskog ulja timijana u koncentraciji od 0,1% nije imao značajan uticaj na povećanje antimikrobne aktivnosti upotrebljenog filma. Najveću efikasnost u smanjenju brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 imao je 1% film hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana. Ova formulacija filma ostvarila je potpunu inaktivaciju ispitivanog soja u toku 96h skladištenja, na temperaturi od 4°C.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma od 1% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 29 (Grafik 24).

Nakon 24h skladištenja prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima kupusa (kontrola) bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su tretirani svim ispitivanim formulacijama 1% hitozana. Između uzoraka 1% hitozana i želatina sa sirćetnom kiselinom utvrđena je značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ . Prosečan broj bakterija u uzorcima 1% hitozana bio je statistički značajno manji od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom.

**Tabela 29. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma 1% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	4.23±0.06 <sup>a</sup>	4.40±0.04 <sup>a</sup>	4.80±0.06 <sup>a</sup>	5.10±0.06 <sup>a</sup>	5.90±0.02 <sup>a</sup>	6.80±0.02 <sup>a</sup>	7.20±0.03 <sup>a</sup>
1% hitozan	4.23±0.06 <sup>a</sup>	3.10±0.06 <sup>b</sup>	2.70±0.12 <sup>b</sup>	2.08±0.12 <sup>b</sup>	1.60±0.11 <sup>b</sup>	0.80±0.70 <sup>b</sup>	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	4.23±0.06 <sup>a</sup>	3.50±0.02 <sup>c</sup>	3.00±0.07 <sup>c</sup>	2.34±0.06 <sup>c</sup>	1.70±0.09 <sup>b,c</sup>	1.00±0.00 <sup>b,c</sup>	ND
1% hitozan i 0,1% mente	4.23±0.06 <sup>a</sup>	3.00±0.09 <sup>b,d</sup>	2.60±0.15 <sup>b,d</sup>	2.00±0.07 <sup>b,d</sup>	1.50±0.15 <sup>b,d</sup>	ND	ND
1% hitozan i 0,2% mente	4.23±0.06 <sup>a</sup>	2.90±0.08 <sup>d,e</sup>	2.40±0.17 <sup>b,d,e</sup>	1.80±0.13 <sup>b,d,e</sup>	1.20±0.17 <sup>d,e</sup>	ND	ND
1% hitozan i 0,1% timijana	4.23±0.06 <sup>a</sup>	2.90±0.11 <sup>d,e,f</sup>	2.30±0.06 <sup>b,d,e,f</sup>	1.60±0.11 <sup>e,f</sup>	1.00±0.00 <sup>d,e,f</sup>	ND	ND
1% hitozan i 0,2% timijana	4.23±0.06 <sup>a</sup>	2.80±0.11 <sup>d,e,f,g</sup>	2.10±0.07 <sup>d,e,g</sup>	1.40±0.17 <sup>e,f,g</sup>	ND	ND	ND

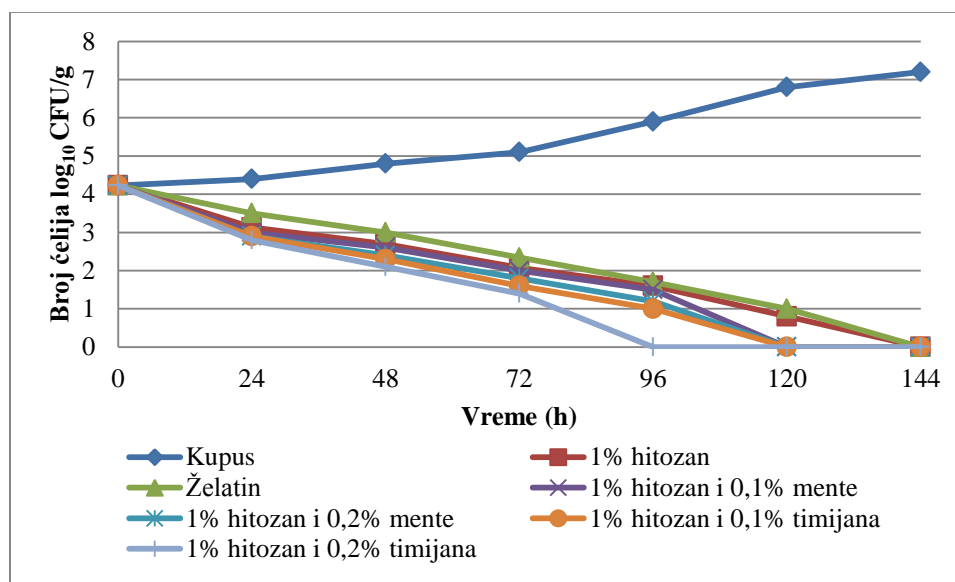
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ), ND – ne može se detektovati.

Nakon 48h utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolnog uzorka kupusa i svih uzoraka koji su skladišteni sa filmovima 1% hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima 1% hitozana bio je statistički značajno manji od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom. Za uzorke kupusa koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i hitozana sa dodatkom 0,1% i 0,2% etarskog ulja mente kao i 0,1% etarskog ulja timijana nije utvrđena statistički značajna razlika, na nivou  $p < 0,05$ .

Nakon 72h utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolnog uzorka kupusa i svih uzoraka koji su skladišteni sa filmovima 1% hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima 1% hitozana bio je statistički značajno manji od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom.

Nakon 96 h prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima kupusa bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su tretirani svim ispitivanim formulacijama 1% hitozana. Između uzoraka 1% hitozana i želatina sa sirćetnom kiselinom nije utvrđena statistički značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ . Za uzorke kupusa koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i hitozana sa dodatkom 0,1% etarskog ulja mente nije utvrđena statistički značajna razlika, na nivou  $p < 0,05$ .



**Grafik 24. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma sa 1% hitozanom i 6% želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Na osnovu rezultata prikazanih na Grafiku 24, može se zapaziti da se početni broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u kupusu povećava za 3 log<sub>10</sub> CFU/g u toku 6 dana skladištenja na temperaturi od 4°C. U uzorcima kupusa koji su skladišteni u prisustvu 1% filma hitozana utvrđeno je statistički značajno (p<0,05) smanjenje brojnosti populacije tokom celog perioda ispitivanja. Upotrebljeni film 1% hitozana izaziva smanjenje početnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 1,5 log<sub>10</sub> CFU/g za period od 48h, odnosno 2,1 log<sub>10</sub> CFU/g za period od 72h. Potpuna inhibicija ispitivanih bakterija ostvarena je nakon 144h. Između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana i želatina sa sirćetnom kiselinom, utvrđena je statistički značajna razlika (p<0,05), tokom prvih 72 h skladištenja (Grafik 24).

Sa sigurnošću od 95%, može se tvrditi da dodatak etarskog ulja mente u koncentraciji od 0,1%, nije uticao na povećanje antimikrobne aktivnosti 1% filma hitozana u toku prvih 48h skladištenja (p>0,05). Najbolji efekat postiže se primenom filma hitozana u koji je dodato etarsko ulje timijana u koncentraciji od 0,2%. Ova formulacija filma ostvarila je potpunu inhibiciju početnog broja bakterija za period od 96h. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19112, dodatak etarskog ulja timijana u koncentraciji od 0,2%, skraćuje vremenski period koji je potreban da se ostvari potpuna inhibicija bakterija za 48h, u poređenju sa 1% filmom hitozana. Ostale formulacije ispitivanih kompozitnih filmova su imale slabiji uticaj na ispitivani soj mikroorganizama tako da je kod njih potpuna inhibicija *L. monocytogenes* ATCC 19112 postignuta nakon 120h skladištenja uzoraka na temperaturi od 4°C.

Vrednosti korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na kupusu u prisustvu 1% kompozitnog filma hitozana (r=0.94), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

#### 5.4.8. Sposobnost rasta *L. monocytogenes* na kupusu u prisustvu 2% kompozitnog filma hitozana sa dodatkom etarskih ulja

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma od 2% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 30 (Grafik 25).

**Tabela 30. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma 2% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

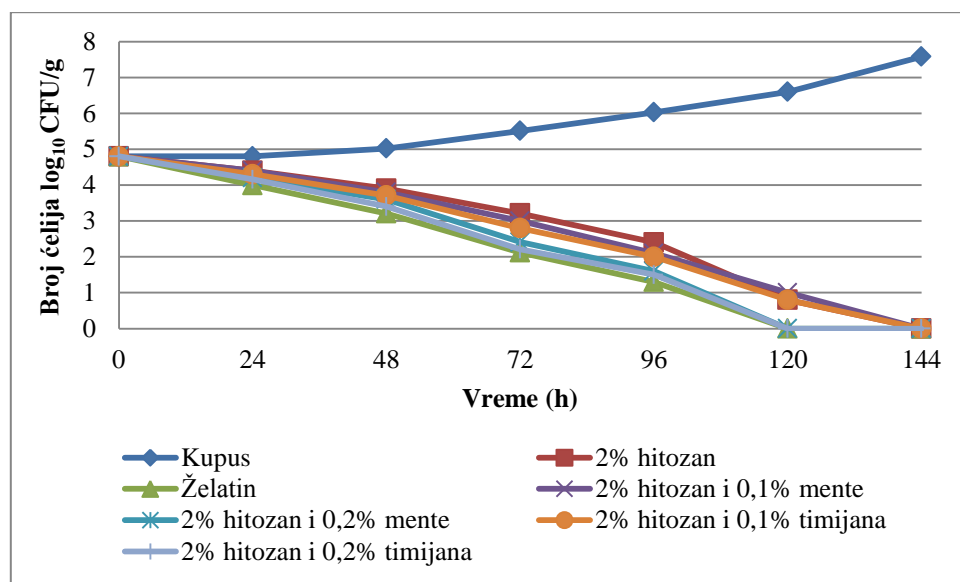
Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 (log <sub>10</sub> CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.80±0.02 <sup>a</sup>	5.00±0.04 <sup>a</sup>	5.50±0.08 <sup>a</sup>	6.00±0.03 <sup>a</sup>	6.60±0.02 <sup>a</sup>	7.60±0.04 <sup>a</sup>
2% hitozan	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.40±0.02 <sup>b</sup>	3.90±0.03 <sup>b</sup>	3.20±0.02 <sup>b</sup>	2.40±0.05 <sup>b</sup>	0.80±0.70 <sup>b</sup>	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.00±0.02 <sup>c</sup>	3.20±0.03 <sup>c</sup>	2.10±0.05 <sup>c</sup>	1.30±0.24 <sup>c</sup>	ND	ND
2% hitozan sa 0.1% mente	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.40±0.02 <sup>b,d</sup>	3.80±0.02 <sup>d</sup>	3.00±0.01 <sup>d</sup>	2.10±0.07 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>d</sup>	ND
2% hitozan sa 0.2% mente	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.20±0.04 <sup>e</sup>	3.60±0.20 <sup>e</sup>	2.40±0.02 <sup>e</sup>	1.60±0.11 <sup>e</sup>	ND	ND
2% hitozan sa 0.1% timijana	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.30±0.04 <sup>f</sup>	3.70±0.02 <sup>f</sup>	2.80±0.02 <sup>f</sup>	2.00±0.05 <sup>f,d</sup>	0.80±0.70 <sup>e</sup>	ND
2% hitozan sa 0.2% timijana	4.80±0.02 <sup>a</sup>	4.20±0.05 <sup>e,g</sup>	3.40±0.07 <sup>g</sup>	2.20±0.04 <sup>g</sup>	1.50±0.17 <sup>e,f,g</sup>	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu svih ispitivanih formulacija 2% hitozana, u vremenu od 24h skladištenja. Takođe je utvrđeno da je broj bakterija u uzorcima sa 2% hitozanom bio značajno veći od broja bakterija u uzorcima želatina, za isti vremenski period. Dodatak 0,2% mente, 0,1% timijana i 0,2% timijana u film 2% hitozana značajno je uticao na povećanje antimikrobne aktivnosti ovog filma. Nije utvrđena statistički značajna razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana i uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana sa dodatkom 0,1% mente.

Nakon 48h skladištenja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između svih ispitivanih filmova hitozana i kontrolnog uzorka kupusa. Takođe je utvrđena statistički

značajna razlika u prosečnom broju bakterija između uzoraka 2% hitozana i uzoraka želatina. Ovakav trend uočen je i u toku skladištenja od 72h odnosno 96h.



**Grafik 25. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma sa 2% hitozanom i želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Primenom 2% filma hitozana ostvarena je značajna inhibicija bakterijskog soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 u poređenju sa kupusom (kontrola), tokom celog perioda ispitivanja (Grafik 25). Potpuna inhibicija ispitivanog bakterijskog soja u prisustvu 2% hitozana postiže se u vremenskom period od 144h. Uzorci koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana i u prisustvu želatina sa sirćetnom kiselinom, statistički se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ), tokom celog perioda ispitivanja. Dodatak etarskog ulja mente u koncentraciji od 0,2% i etarskog ulja timijana u koncentracijama od 0,2% uticao je značajno na povećanje antimikrobne aktivnosti filma hitozana. Najveću antimikrobnu aktivnost ispoljio je 2% film hitozana sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana. Sa ovom formulacijom filma postiže se potpuna inhibicija bakterija za vreme od 120h.

Rezultati dobijeni ispitivanjem rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma od 2% hitozana i 6% želatina prikazani su u Tabeli 31 (Grafik 26).

Nakon 24h skladištenja prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima kupusa (kontrola) bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su tretirani svim ispitivanim formulacijama 2% hitozana. Između uzoraka 2% hitozana i želatina sa sirćetnom kiselinom utvrđena je značajna razlika na nivou  $p < 0,05$ . Prosečan broj bakterija u uzorcima 2% hitozana bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom. Za uzorke kupusa koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana i hitozana sa dodatkom etarskih ulja utvrđena je statistički značajna razlika, na nivou  $p < 0,05$  za prvih 24h skladištenja.

Nakon 48h utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolnog uzorka kupusa i svih uzoraka koji su skladišteni sa filmovima 2% hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima 2% hitozana bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom. Za uzorke kupusa koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana i hitozana sa dodatkom 0,1% etarskog ulja mente nije utvrđena statistički značajna razlika, na nivou  $p < 0,05$ .

**Tabela 31. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma 2% hitozana sa dodatkom etarskih ulja**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Kupus	5.10±0.02 <sup>a</sup>	5.40±0.01 <sup>a</sup>	5.80±0.02 <sup>a</sup>	6.20±0.04 <sup>a</sup>	7.10±0.02 <sup>a</sup>	8.00±0.03 <sup>a</sup>	8.50±0.02 <sup>a</sup>
2% hitozan	5.10±0.02 <sup>a</sup>	4.70±0.03 <sup>b</sup>	4.20±0.08 <sup>b</sup>	3.40±0.03 <sup>b</sup>	2.50±0.02 <sup>b</sup>	1.40±0.10 <sup>b</sup>	ND
Želatin sa 1% sirćetnom kiselinom	5.10±0.02 <sup>a</sup>	4.30±0.02 <sup>c</sup>	3.90±0.02 <sup>b,c</sup>	3.10±0.04 <sup>c</sup>	2.30±0.03 <sup>c</sup>	1.50±0.20 <sup>c,b</sup>	ND
2% hitozan i 0,1% mente	5.10±0.02 <sup>a</sup>	4.60±0.02 <sup>d</sup>	4.00±0.03 <sup>b,d</sup>	3.00±0.02 <sup>d</sup>	2.20±0.05 <sup>d</sup>	1.40±0.10 <sup>d</sup>	ND
2% hitozan i 0,2% mente	5.10±0.02 <sup>a</sup>	4.50±0.02 <sup>e</sup>	3.90±0.01 <sup>d,e</sup>	2.70±0.02 <sup>e</sup>	1.90±0.09 <sup>e</sup>	1.10±0.17 <sup>e</sup>	ND
2% hitozan i 0,1% timijana	5.10±0.02 <sup>a</sup>	4.60±0.02 <sup>d,f</sup>	3.80±0.04 <sup>f</sup>	2.90±0.02 <sup>f</sup>	2.00±0.05 <sup>e,f</sup>	1.00±0.00 <sup>f,e</sup>	ND
2% hitozan i 0,2% timijana	5.10±0.02 <sup>a</sup>	4.40±0.03 <sup>g</sup>	3.60±0.02 <sup>g</sup>	2.50±0.03 <sup>g</sup>	1.70±0.12 <sup>e,g</sup>	ND	ND

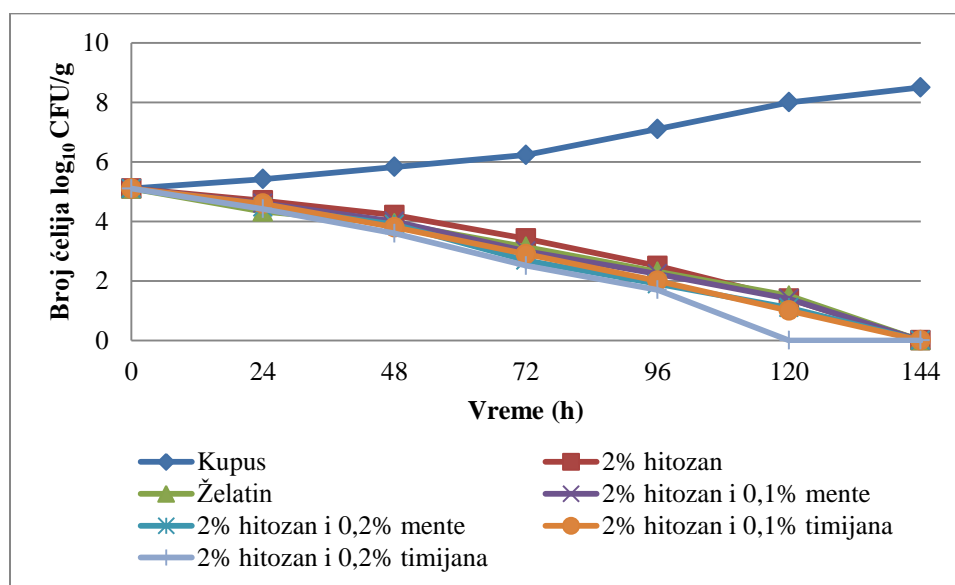
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija.

Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ), ND – ne može se detektovati.

Nakon 72h utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolnog uzorka kupusa i svih uzoraka koji su skladišteni sa filmovima 2% hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima 2% hitozana bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u

uzorcima sa želatinom. Za sve uzorke kupusa koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana i hitozana sa dodatkom etarskih ulja utvrđena je statistički značajna razlika, na nivou  $p < 0,05$ .

Nakon 96h prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima kupusa bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ) od prosečnog broja bakterija u uzorcima koji su tretirani svim ispitivanim formulacijama 2% hitozana. Prosečan broj bakterija u uzorcima 2% hitozana bio je statistički značajno veći od prosečnog broja bakterija u uzorcima sa želatinom. Za sve uzorke kupusa koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana i hitozana sa dodatkom etarskih ulja utvrđena je statistički značajna razlika, na nivou  $p < 0,05$ .



**Grafik 26. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 na sveže sečenom kupusu u prisustvu kompozitnog filma sa 2% hitozanom i 6% želatinom sa dodatkom etarskih ulja**

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 26) može se uočiti da se početni broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u kupusu povećava za 3,4  $\log_{10}$  CFU/g u toku 6 dana skladištenja, na temperaturi od 4°C. U uzorcima kupusa koji su skladišteni u prisustvu 2% filma hitozana utvrđeno je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje brojnosti populacije tokom celog perioda ispitivanja. Upotrebljeni film 2% hitozana izaziva smanjenje početnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 od 0,9  $\log_{10}$  CFU/g za period od 48h, odnosno 1,7  $\log_{10}$  CFU/g za period od 72h. Sam film želatina pripremljen sa sirćetnom kiselinom, izaziva smanjenje početnog broja bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19112 u



kupusu od  $1,2 \log_{10}$  CFU/g za 48h odnosno  $2 \log_{10}$  CFU/g za period od 72h. Na osnovu prikazanih rezultata, može se uočiti da sam 2% hitozan, nije efikasan u inhibiciji rasta ispitivanog soja bakterija u kupusu na temperaturi od 4°C.

Vrednosti korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 na kupusu u prisustvu 2% kompozitnog filma hitozana ( $r=0.99$ ), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ispitivanih populacija na nivou značajnosti 0,05.

### 5.5. Preživljavanje sojeva *L. monocytogenes* u majonezu sa dodatkom hitozana

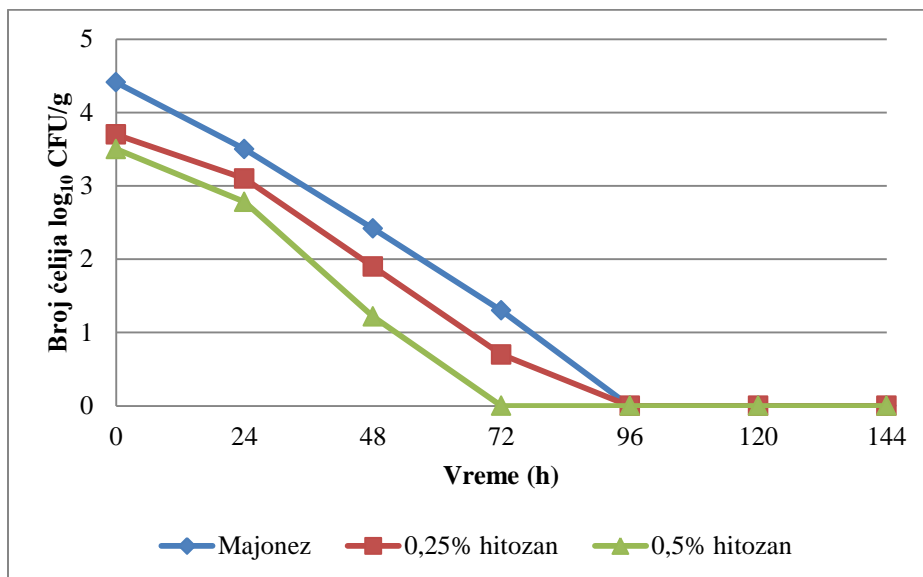
Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu u prisustvu 0,25% i 0,5% hitozana prikazani su u Tabeli 32 (Grafik 27).

**Tabela 32. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu sa dodatkom 0,25% i 0,5% hitozana**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 ( $\log_{10}$ CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Majonez	$4.41 \pm 0.04^a$	$3.50 \pm 0.02^a$	$2.42 \pm 0.04^a$	$1.30 \pm 0.24^a$	ND	ND	ND
0,25% hitozan	$3.70 \pm 0.03^b$	$3.10 \pm 0.09^b$	$1.90 \pm 0.06^b$	$0.70 \pm 0.60^{ab}$	ND	ND	ND
0,5% hitozan	$3.50 \pm 0.03^c$	$2.78 \pm 0.03^{bc}$	$1.22 \pm 0.17^c$	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja  $\pm$  standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Na početku ispitivanja je utvrđena značajna razlika u prosečnom broju bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u svim ispitivanim uzorcima majoneza. Razlika u brojnosti populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115, koja je ostvarena nakon prvog dana skladištenja između majoneza (kontrola) i uzoraka sa dodatim hitozanom iznosila je  $0,4 \log_{10}$  CFU/g za 0,25% hitozan, odnosno  $0,7 \log_{10}$  CFU/g za 0,5% hitozan. Tokom naredna dva dana skladištenja, utvrđeno je da je prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu bio značajno veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na broj bakterija u uzorcima sa dodatim hitozanom u koncentraciji od 0,25 ili 0,5%. Nakon 96h skladištenja, ispitivana bakterijska vrsta se nije više mogla detektovati ni u jednom od uzoraka majoneza.



**Grafik 27. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu uz dodatak 0,25% i 0,5% hitozana**

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 27), može se zapaziti da se početni broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu smanjio za 0,9 log<sub>10</sub> CFU/g za period od 24h odnosno za 2 log<sub>10</sub> CFU/g za 48h. Rezultati pokazuju da obe upotrebljene koncentracije hitozana značajno utiču na smanjenje prosečnog broja ispitivanih bakterija u poređenju sa kontrolom (majonez). Potpuna inhibicija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu uz dodatak hitozana, ostvarena je nakon 72h u majonezu sa dodatkom 0,5% hitozana.

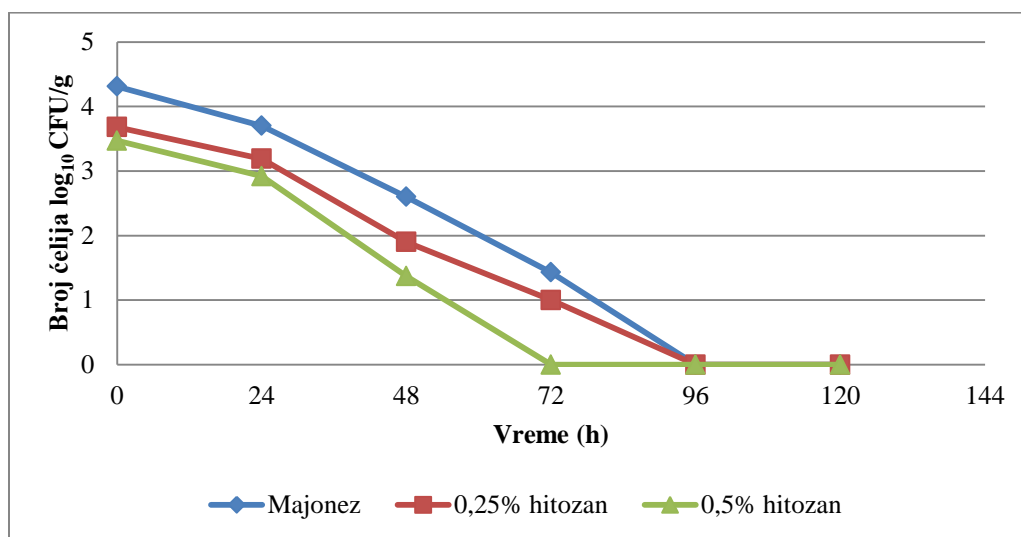
Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti rasta *L. monocytogenes* ATCC 19112 u majonezu u prisustvu 0,25% i 0,5% hitozana prikazani su u Tabeli 33 (Grafik 28).

**Tabela 33. Broj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u majonezu sa dodatkom 0,25% i 0,5% hitozana**

Tretman	Broj <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (log <sub>10</sub> CFU/g)						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Majonez	4.31±0.05 <sup>a</sup>	3.70±0.03 <sup>a</sup>	2.60±0.12 <sup>a</sup>	1.43±0.10 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
0,25% hitozan	3.68±0.03 <sup>b</sup>	3.19±0.10 <sup>b</sup>	1.90±0.13 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>a,b</sup>	ND	ND	ND
0,5% hitozan	3.47±0.03 <sup>c</sup>	2.90±0.08 <sup>c</sup>	1.37±0.10 <sup>b,c</sup>	ND	ND	ND	ND

Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ ), ND – ne može se detektovati.

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafik 28), može se zaključiti da obe upotrebljene koncentracije hitozana značajno utiču na smanjenje prosečnog broja ispitivanih bakterija u poređenju sa kontrolom (majonez). Potpuna inhibicija početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19112 postiže se nakon 72h skladištenja i to sa filmom 0,5% hitozana.



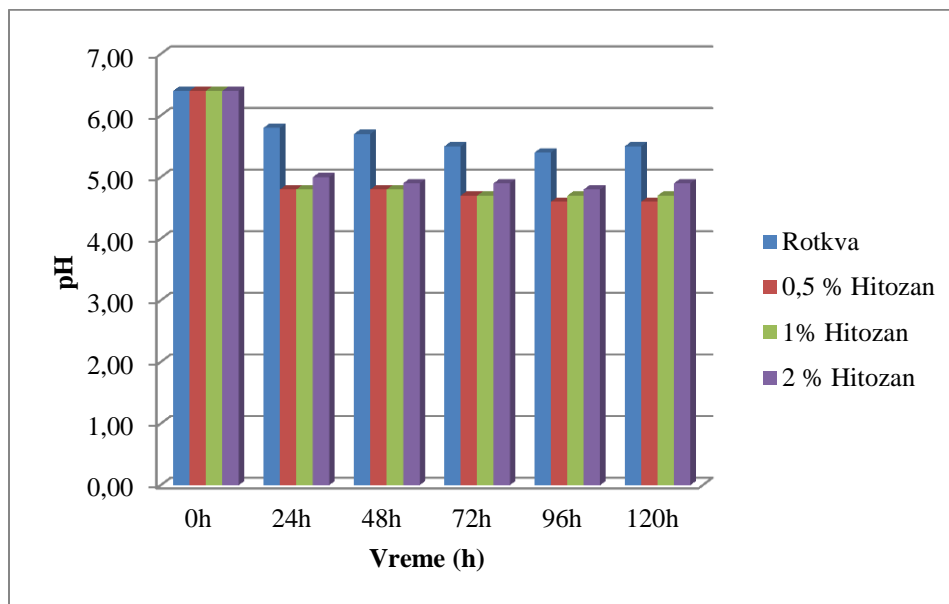
**Grafik 28. Promena populacije *L. monocytogenes* ATCC 19112 u majonezu uz dodatak 0,25% i 0,5% hitozana**

Vrednosti korelacionog koeficijenta za rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 u majonezu ( $r=0.99$ ), ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost. Ispitivanjem značajnosti koeficijenta korelacije, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) između ispitivanih populacija.

## 5.6. Uticaj filmova hitozana na pH vrednost povrća

U ovom delu rada prikazani su rezultati ispitivanja uticaja sirćetne kiseline iz filmova hitozana na osobine uskladištenog povrća. Rezultati promene pH vrednosti kod uzoraka crne rotkve koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana, prikazani su na Grafiku 29.

Početna pH vrednost netretirane rotkve iznosila je 6.4. Tokom prvih 24h skladištenja utvrđeno je smanjenje pH vrednosti u kontrolnom uzorku rotkve za 9,4% u odnosu na početnu vrednost.

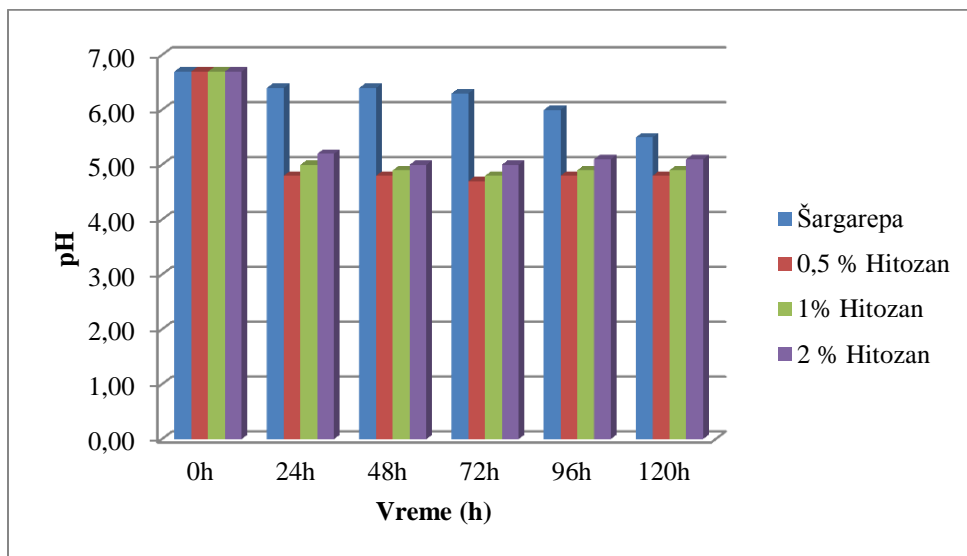


**Grafik 29. Promena pH vrednosti u rotkvi u prisustvu filmova hitozana**

Ukupno smanjenje pH vrednosti kod kontrolnog uzorka rotkve iznosilo je 14,1%, nakon 120h skladištenja. Kod sečenog povrća koje je skladišteno u prisustvu filmova hitozana, uočena je značajna promena pH povrća. Kod uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozan filma, utvrđeno je smanjenje pH vrednosti od 25% već nakon prvih 24h skladištenja dok je ukupno smanjenje pH iznosilo 28,2%, nakon 120h skladištenja. Kod uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 1% filma hitozana, smanjenje od 25% uočeno je u toku prvih 24h, a ukupno smanjenje pH je iznosilo 26,9%. Najmanji uticaj na promenu pH u povrću imao je 2% film hitozana kod koga je nakon prvih 24h skladištenja utvrđeno smanjenje pH od 21,9% dok je ukupna promena nakon 120h skladištenja iznosila 23,4%.

Iz prikazanih rezultata (Grafik 29), može se videti da utvrđene pH vrednosti kod povrća koje je skladišteno u prisustvu filmova hitozana, ostaju praktično nepromenjene tokom celog perioda skladištenja (120h).

Rezultati promene pH vrednosti kod uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana, prikazani su na Grafiku 30. Početna pH vrednost šargarepe iznosila je 6.7. Tokom prvih 24h skladištenja utvrđeno je značajno smanjenje pH vrednosti u kontrolnom uzorku šargarepe za 4.5% u odnosu na početnu vrednost.



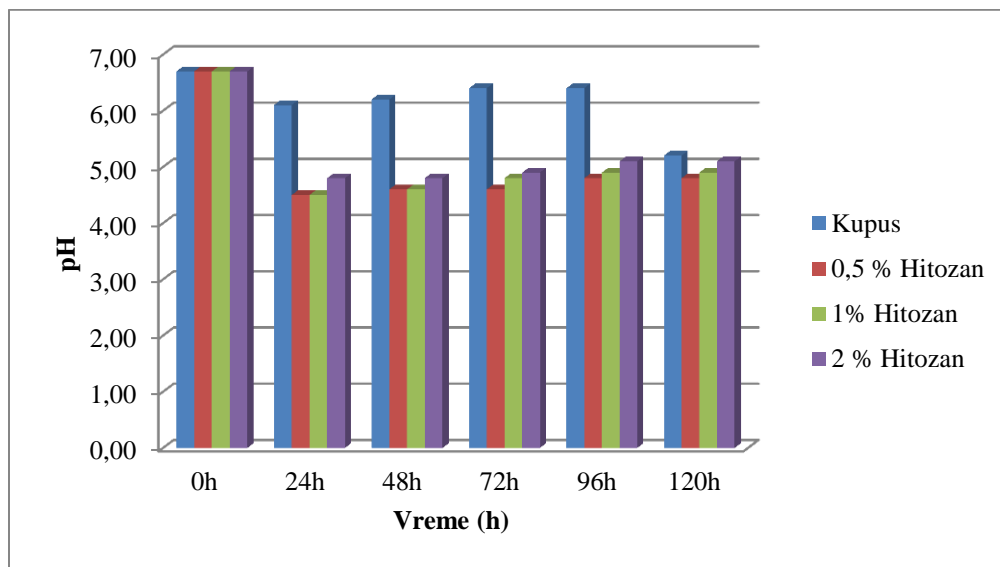
**Grafik 30. Promena pH vrednosti u šargarepi u prisustvu filmova hitozana**

Ukupno smanjenje pH vrednosti kontrolnog uzorka šargarepe iznosilo je 18%, nakon 120h skladištenja. Kod sečenog povrća koje je skladišteno u prisustvu filmova hitozana, uočeno je značajno smanjenje pH povrća. Kod uzoraka koji su skladišteni u prisustvu 0.5% hitozan filma, utvrđeno je smanjenje pH vrednosti od 28.4% već nakon prvih 24h skladištenja.

Kod uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu 1% filma hitozana, smanjenje od 25.4% uočeno je za prvih 24h, dok je ukupno smanjenje pH iznosilo 26.9%. Najmanji uticaj na promenu pH u povrću imao je 2% film hitozana kod koga je nakon prvih 24h skladištenja utvrđeno smanjenje pH od 22.4%. Ukupna promena pH vrednosti kod 2% filma hitozana iznosila je 23.9%, nakon 120h skladištenja.

Rezultati promene pH vrednosti kod uzoraka kupusa koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana, prikazani su na Grafiku 31.

Početna pH vrednost kupusa (6.7) opada tokom skladištenja u svim uzorcima kupusa. Kod uzoraka kupusa je nakon prvih 24h skladištenja zabeleženo smanjenje pH od 9%, dok je ukupno smanjenje nakon 120h skladištenja iznosilo 22.4%.



**Grafik 31. Promena pH vrednosti u kupusu u prisustvu filmova hitozana**

Smanjenje pH kupusa za 32.8% u toku prvih 24h, uočeno je u prisustvu 0.5% i 1% filma hitozana. Kod uzoraka kupusa koji su skladišteni u prisustvu 2% filma hitozana, smanjenje od 28.4% uočeno je prvih 24h, dok je ukupno smanjenje pH, nakon 120h skladištenja, iznosilo 23.9%.

### 5.7. Uticaj različitih koncentracija filmova hitozana na sadržaj suve materije povrća

Sve komponente hemijskog sastava povrća koje nisu voda, čine suhu materiju. Suva materija se sastoji iz rastvorljivih (šećeri, kiseline i druge rastvorljive materije) i nerastvorljivih materija (skrob, celuloza, hemiceluloza, protopektin i dr.). Zato se sadržaj u vodi rastvorene suve materije, pre svega odnosi na sadržaj ugljenih hidrata odnosno šećera, koji obično čine više od 95% suve materije.

Određivanje suve materije je jedna od najvažnijih i najviše korišćenih hemijskih metoda u ispitivanju kvaliteta voća i povrća. Kod svih vrsta voća i većine povrća, sadržaj suve materije je primarna karakteristika koja pruža značajne podatke o kvalitetu proizvoda. Rezultati ispitivanja sadržaja suve materije u povrću koje je skladišteno u prisustvu filmova hitozana, prikazani su u Tabeli 34.

**Tabela 34. Suva materija rastvorljiva u vodi**

Tretman	Sadržaj suve materije (%) u povrću					
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
Rotkva kontrola	7.80±0.38 <sup>a</sup>	7.25±0.25 <sup>a</sup>	7.03±0.06 <sup>a</sup>	7.10±0.11 <sup>a</sup>	7.00±0.25 <sup>a</sup>	6.80±0.29 <sup>a</sup>
0.5% hitozan	7.80±0.38 <sup>a</sup>	5.23±0.25 <sup>a</sup>	5.11±0.13 <sup>b</sup>	5.23±0.25 <sup>b</sup>	5.33±0.29 <sup>b</sup>	5.40±0.53 <sup>b</sup>
1% hitozan	7.80±0.38 <sup>a</sup>	5.53±0.06 <sup>a</sup>	5.16±0.29 <sup>b</sup>	5.16±0.15 <sup>b</sup>	5.46±0.06 <sup>b</sup>	5.50±0.25 <sup>b</sup>
2% hitozan	7.80±0.38 <sup>a</sup>	5.50±0.25 <sup>a</sup>	5.25±0.25 <sup>b</sup>	5.25±0.00 <sup>b</sup>	5.30±0.16 <sup>b</sup>	5.40±0.15 <sup>b</sup>
Kupus kontrola	6.90±0.38 <sup>a</sup>	5.43±0.51 <sup>a</sup>	4.75±0.25 <sup>a</sup>	3.30±0.38 <sup>a</sup>	3.20±0.09 <sup>a</sup>	2.80±0.25 <sup>a</sup>
0.5% hitozan	6.90±0.38 <sup>a</sup>	4.80±0.14 <sup>a</sup>	4.73±0.03 <sup>a</sup>	4.16±0.28 <sup>b</sup>	4.40±0.26 <sup>b</sup>	3.90±0.19 <sup>b</sup>
1% hitozan	6.90±0.38 <sup>a</sup>	4.70±0.26 <sup>a</sup>	4.48±0.63 <sup>a</sup>	4.50±0.25 <sup>b</sup>	4.60±0.12 <sup>b</sup>	3.90±0.42 <sup>b</sup>
2% hitozan	6.90±0.38 <sup>a</sup>	4.75±0.25 <sup>a</sup>	4.60±0.43 <sup>a</sup>	4.26±0.25 <sup>b</sup>	4.28±0.20 <sup>b</sup>	4.30±0.26 <sup>b</sup>
Šargarepa kontrola	8.80±0.25 <sup>a</sup>	8.42±0.14 <sup>a</sup>	7.60±0.36 <sup>a</sup>	7.76±0.25 <sup>a</sup>	7.70±0.20 <sup>a</sup>	7.70±0.20 <sup>a</sup>
0.5% hitozan	8.80±0.25 <sup>a</sup>	5.58±0.45 <sup>b</sup>	5.66±0.52 <sup>b</sup>	5.60±0.31 <sup>b</sup>	5.90±0.26 <sup>b</sup>	5.43±0.20 <sup>b</sup>
1% hitozan	8.80±0.25 <sup>a</sup>	6.48±0.36 <sup>b</sup>	6.18±0.16 <sup>b</sup>	6.10±0.19 <sup>b</sup>	6.45±0.18 <sup>b,c</sup>	6.10±0.53 <sup>b</sup>
2% hitozan	8.80±0.25 <sup>a</sup>	6.02±0.27 <sup>b</sup>	5.75±0.43 <sup>b</sup>	5.70±0.20 <sup>b</sup>	5.88±0.12 <sup>b,d</sup>	5.98±0.42 <sup>b</sup>

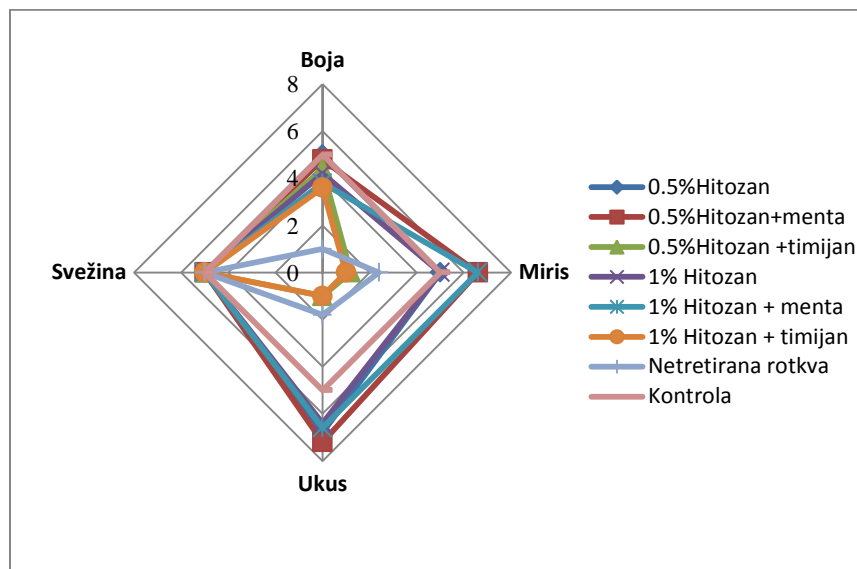
Vrednosti u tabeli su predstavljene kao aritmetička sredina tri eksperimentalna merenja ± standardna devijacija. Vrednosti aritmetičke sredine sa različitim slovima u superskriptu u istoj koloni značajno se razlikuju ( $p < 0.05$ )

Sadržaj šećera u netretiranim uzorcima povrća kreće se u rasponu od 6.9±0.4 (kupus) do 8.8±0.3 (šargarepa). U svim uzorcima povrća evidentirano je smanjenje sadržaja suve materije, u toku 120h skladištenja. Ukupno smanjenje sadržaja suve materije, nakon 120h skladištenja, iznosilo je kod kupusa 59.4%, dok je kod šargarepe i rotkve smanjenje sadržaja suve materije iznosilo 12.5% odnosno 12.8%.

Kod uzoraka rotkve koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana nije zabeleženo značajno variranje sadržaja suve materije. Ostvareno smanjenje sadržaja suve materije u poređenju sa kontrolnim uzorkom kreće se u rasponu od 29.5% (za 1% film hitozana) do 30.8% (za 0.5% i 2% film). Kod uzoraka kupusa koji su skladišteni u prisustvu 0.5% i 1% hitozana, ostvareno je smanjenje sadržaja šećera od 43.5%.

### 5.8. Senzorna analiza

Senzorna analiza sveže sečenog, minimalno prerađenog povrća obuhvatila je ocenu sledećih karakteristika: ukus, miris, boja i svežina. Boja i izgled povrća imaju najveći uticaj na ukupan kvalitet proizvoda i odluku potrošača o njegovoj prihvatljivosti (Barrett et al., 2010). Tek nakon procene boje i izgleda povrća, potrošači procenjuju i druge karakteristike kao što su ukus, miris i svežina. Senzorna ocena sveže sečene rotkve u prisustvu filmova hitozana prikazana je na Grafiku 32.



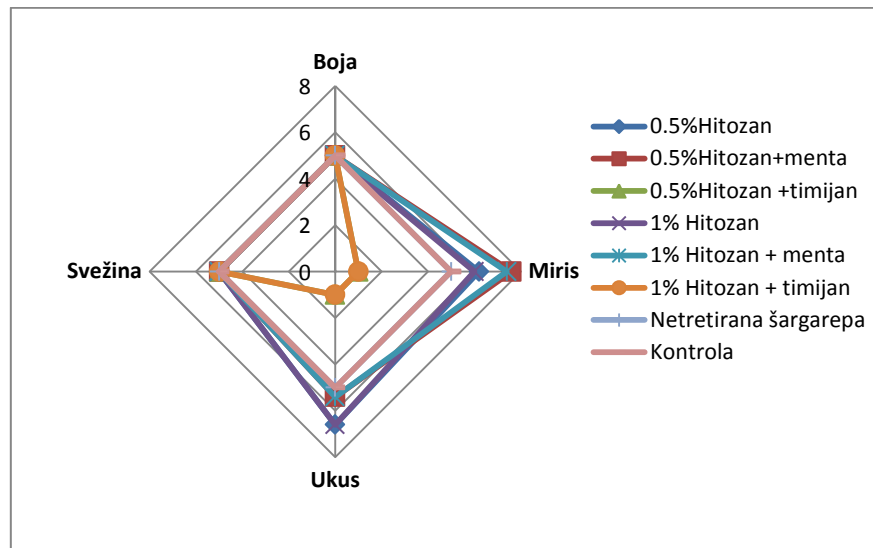
**Grafik 32. Sensorna analiza rotkve nakon četiri dana skladištenja na 4°C**

Miris povrća je karakterističan kod svih uzoraka skladištenih u prisustvu filmova hitozana, dok je kod uzoraka sa dodatkom etarskog ulja mente izražen i tipičan za upotrebljeno etarsko ulje. Miris uzoraka sa dodatkom mente je ocenjen 73,3% od maksimuma, dok su uzorci sa dodatkom timijana ocenjeni kao neprihvatljivi. Ukus povrća u prisustvu 0,5% i 1% filma hitozana ocenjen je 75.5% odnosno 71.1% od maksimuma. Dodatak etarskog ulja mente ocenjen je 80% od maksimuma kod uzoraka rotkve koji su čuvani u prisustvu 0,5% filma sa mentom. Etarsko ulje timijana imalo je potpuno neprihvatljiv uticaj na ukus skladištenog povrća. Kod svih uzoraka osim rotkve skladištene u prisustvu 0.5% filma hitozana, evidentirana je promena boje.

Senzorna ocena sveže sečene šargarepe u prisustvu filmova hitozana prikazana je na Grafiku 33.

Na osnovu rezultata senzorne analize može se videti da su boja i svežina šargarepe tipične i nepromenjene tokom celog perioda ispitivanja. Miris uzoraka sa 0,5% filmom hitozana i dodatkom mente je ocenjen 84,4% od maksimuma, dok su uzorci sa 1% filmom hitozana i dodatkom mente ocenjeni 82,2% od maksimuma. Ukus uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu ispitivanih filmova hitozana je ocenjen 73,3% od maksimuma. Miris i ukus uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu filmova sa etarskim uljem timijana imao je neprihvatljiv uticaj na senzorne karakteristike povrća.

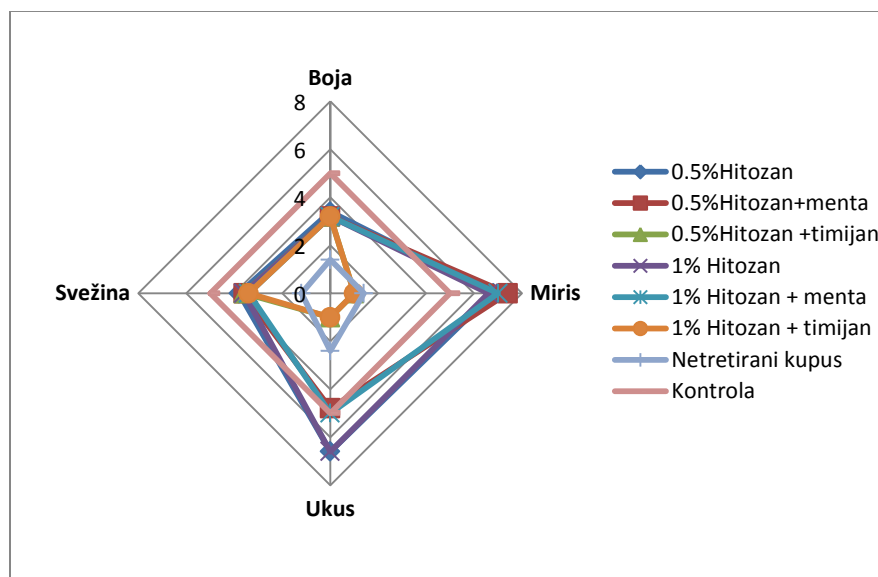




**Grafik 33. Senzorna analiza šargarepe nakon četiri dana skladištenja na 4°C**

Senzorna ocena sveže sečenog kupusa u prisustvu filmova hitozana prikazana je na Grafiku 34.

Analizirani uzorci sveže sečenog kupusa pokazali su značajnu promenu boje i svežine u toku četiri dana skladištenja na 4°C. Miris povrća u prisustvu 0,5% i 1% filma hitozana ocenjen je 75,5% odnosno 73,3% od maksimuma. Dodatak etarskog ulja mente uticao je značajno na poboljšanje mirisa kod uskladištenog povrća.



**Grafik 34. Senzorna analiza kupusa nakon četiri dana skladištenja na 4°C**

Najveće ocene dobili su uzorci kupusa koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana sa dodatkom mente i oni su ocenjeni 82,2% od maksimuma. Na osnovu rezultata senzorne analize može se zaključiti da je ukus kupusa koji je skladišten u prisustvu 0,5% i 1% filma hitozana ocenjen 73,3% od maksimuma dok je dodatak etarskog ulja mente imao prihvatljiv uticaj na ovu senzornu karakteristiku povrća.

Uzorci kupusa koji su skladišteni u prisustvu filmova hitozana sa dodatkom etarskog ulja timijana, ocenjeni su najnižim ocenama za ukus i miris. Kod netretiranog uzorka kupusa evidentirane su najveće promene senzornih karakteristika, u poređenju sa kontrolom.

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja na rast *L. monocytogenes* dobro je proučena od strane većeg broja autora. Smatra se da antimikrobna aktivnost etarskih ulja može biti rezultat ometanja fosfolipidnog sloja ćelijske membrane, što dovodi do povećane propustljivosti i gubitka ćelijskih sastojaka ili se može povezati sa promenama i oštećenjem genetskog materijala ćelije. Takođe, antimikrobna aktivnost etarskih ulja može biti rezultat ometanja različitih enzimskih sistema koji su povezani sa proizvodnjom energije u ćeliji ili sintezom njenih strukturnih komponenti (Chi, 2004).

Dobijeni rezultati pokazuju da etarska ulja timijana i mente ispoljavaju najsnažniju antimikrobnu aktivnost na oba testirana soja bakterija. Ispitujući efekat etarskih ulja prema različitim mikroorganizmima, i drugi autori su zabeležili da timijan ima izraženo antimikrobno dejstvo. Prema rezultatima Klaus et al. (2008) etarska ulja timijana, žalfije, ružmarina i majorana ispoljavaju značajnu antimikrobnu aktivnost i mogla bi se koristiti u kontroli rasta patogenih mikroorganizama u hrani. Rezultati Duduk et al. (2010), pokazuju da etarsko ulje timijana može biti veoma efikasno u sprečavanju rasta patogene gljive *Colletotrichum acutatum* koja je jedan od najznačajnijih prouzrokovaca oboljenja jagoda. Prema rezultatima ovih autora, procenat inhibicije zavisio je od primenjene količine etarskog ulja timijana. Jaka inhibicija porasta *Colletotrichum acutatum* uočena je pri koncentracijama od 46 µl/l vazduha i višim (94,5-100%). Međutim, dejstvo etarskog ulja je bilo fungicidno ili fungistatično. Minimalna inhibitorna koncentracija etarskog ulja timijana je pri koncentraciji 76 µl/l vazduha, a minimalna fungicidna koncentracija pri koncentraciji od 107 µl/l vazduha. Smanjivanjem koncentracije etarskog ulja opadao je i inhibitorni efekat. Etarsko ulje timijana izgubilo je antifungalno dejstvo pri koncentracijama od 3,82 µl/l vazduha. Ispitivanjem uticaja etarskih ulja timijana, cimeta i origana na rast bakterija, kvasaca i plesni koji se javljaju kao uzročnici kvarenja hrane, rezultati Lopez et al. (2007) su pokazali da etarsko ulje timijana ima najsnažniju antimikrobnu aktivnost. Ovi autori ukazuju da antimikrobna aktivnost etarskog ulja timijana značajno zavisi od koncentracije timola u njemu. Literaturni podaci ukazuju da različite komponente koje ulaze u sastav

etarskih ulja mogu doprineti njihovoj antimikrobnoj aktivnosti i da ona ne zavisi samo od najzastupljenije komponente etarskog ulja (Santana-Rios et al., 2001; Faleiro et al., 2003; Hoet et al., 2006).

Ispitivanjem antimikrobne i antioksidativne aktivnosti etarskih ulja *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* i *Mentha aquatica*, Dukić et al. (2003.), nalaze da sva etarska ulja pokazuju snažnu antimikrobnu aktivnost, naročito protiv vrste *Escherichia coli*. Najsnažnije dejstvo imalo je etarsko ulje *Mentha piperita* i to prema multirezistentnim vrstama *Shigella sonnei* i *Micrococcus flavus* ATTC 10240. Ispitivana etarska ulja su pokazala značajnu fungicidnu i fungistatičnu aktivnost, pri čemu su etarska ulja *Mentha piperita* i *Mentha longifolia* bila mnogo efikasnija od etarskog ulja *Mentha aquatica*. Ispitujući efekat etarskog ulja *Mentha longifolia* L. i *Mentha viridis*, Mkaddem et al. (2009) nalaze da je najzastupljeniji sastojak etarskog ulja *Mentha longifolia* pulegon (54,41%) a *Mentha viridis* karvon (50,47%). Najsnažniju antimikrobnu aktivnost ova etarska ulja su ispoljila prema vrstama *L. monocytogenes* i *Klebsiella pneumonia*, dok je najmanja osetljivost uočena kod *E. coli*. Snažnu aktivnost etarska ulja su ispoljila i prema kvascima i plesnima. Prema rezultatima Shailendra i Ruchi (2013), etarsko ulje *Mentha spicata* ispoljava antimikrobnu aktivnost protiv *Salmonella enterica enterica*, *Escherichia coli* i *Pasturella multocida*.

Nekoliko naučnih studija je pokazalo da je etarsko ulje bosiljka manje efikasno u inhibiciji *L. monocytogenes* i *Pseudomonas aeruginosa* u poređenju sa drugim Gram (+) i Gram (-) bakterijama. Međutim, rezultati Hossain et al. (2010), pokazuju da etarsko ulje bosiljka kao i ekstrakt bosiljka sa metanolom, ispoljava značajnu antibakterijsku aktivnost protiv *L. monocytogenes* i ostalih testiranih bakterija. Istraživanja inhibitornog efekta etarskih ulja aromatičnih biljaka na sojeve *L. monocytogenes*, *L. innocua* i *S. aureus*. *L. innocua* su pokazala da su tri soja *L. monocytogenes* osetljivija na etarsko ulje izolovano iz *Ocimum gratissimum* nego na ulje iz *Ocimum basilicum* dok je jedan soj *L. monocytogenes* bio otporan na etarsko ulje izolovano iz *Ocimum basilicum* (Nguefack et al., 2004). Naši rezultati pokazuju da etarsko ulje peršuna ispoljava veoma slabu antimikrobnu aktivnost na oba ispitivana bakterijska soja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Boucinha Teixeira, 2013).

Generalno se može zaključiti da su ispitivani predstavnici G (+) bakterija osetljiviji na delovanje etarskih ulja, u poređenju sa G (-) negativnim bakterijama. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Ceylan i Fung, 2004; Al-Bayati, 2008).

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mešavine etarskih ulja pokazalo je da kod oba soja *L. monocytogenes* najveća zona inhibicije je ostvarena sa mešavinom timijana i bosiljka. Naši rezultati pokazuju da dodatak etarskog ulja timijana značajno povećava antimikrobnu aktivnost drugih ispitivanih etarskih ulja. Međutim, ni jedna ispitivana kombinacija etarskih ulja nije omogućila povećanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja timijana.

I rezultati drugih autora ukazuju da mešavine etarskih ulja, ekstrakata ili kombinacije različitih osnovnih sastojaka etarskih ulja mogu ispoljiti odgovarajući antimikrobni efekat prema mikroorganizmima (Ribar et al., 2000).

Gutierrez et al., (2009) su ispitivali sinergistički efekat različitih kombinacija etarskih ulja u modelu sa listovima zelene salate i izražavaju ga kao indeks frakcione inhibitorne koncentracije (FIC). Indeks frakcione inhibitorne koncentracije je izračunat kao odnos između minimalne inhibitorne koncentracije dobijene za komponente u mešavini i minimalne inhibitorne koncentracije za čistu komponentu. Rezultat je predstavljen kao sinergija ( $FIC < 0,5$ ), dopuna ( $0,5 < FIC < 1$ ), indiferentnost ( $1 < FIC < 4$ ) ili antagonizam ( $FIC > 4$ ). Rezultati ovih autora pokazuju da nikakav sinergistički efekat nije uočen kod različitih mešavina etarskih ulja, dok je dopunski efekat ispoljen kod većeg broja mešavina. Veća učestalost dopunskog efekta je pronađena kod mešavina etarskih ulja protiv sojeva *Listeria*. Kombinacije origana sa timijanom ili matičnjakom bile su najefikasnije protiv *L. monocytogenes*.

Za uspešnu primenu etarskih ulja u različitim modelima hrane, neophodno je utvrditi moguće interakcije između etarskih ulja i komponenata hrane. Postoje brojni primeri u kojima neke studije ukazuju da su biljni ekstrakti korisni u smanjenju patogena u nekim prehrambenim proizvodima, dok drugi pokazuju veoma slabu ili neznatnu antimikrobnu aktivnost kada se ista etarska ulja primenjuju na neki drugi proizvod. Zbog toga primena etarskih ulja zahteva procenu njihove efikasnosti u okviru prehrambenih proizvoda ili u model sistemima koji su po svom hemijskom sastavu slični hrani u kojoj će

se primenjivati, jer efikasnost mnogih antimikrobnih sredstava može biti smanjena zbog određenih komponenata hrane. Primena etarskih ulja u različitim modelima hrane nalazi opravdanje i sa zdravstvenog aspekta jer su pojedini njihovi sastojci kao što su cinamaldehyd, timol i karvakrol prepoznati od strane US FDA kao GRAS i bezbedni su za upotrebu (Cocchiara et al., 2005; Bickers et al., 2005).

## **6.2. Antimikrobna aktivnost povrća na rast *L. monocytogenes***

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti sveže sečenog kupusa, šargarepe i crne rotkve, kao i njihovih različitih mešavina dobijeni rezultati pokazuju da kupus predstavlja dobar supstrat za rast oba soja *L. monocytogenes*. U toku šest dana skladištenja kupusa na temperaturi od 4°C, brojnost populacije *L. monocytogenes* ATCC 19115 povećala se za 1,9 log<sub>10</sub> CFU/g, dok je kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 zabeleženo povećanje od 3,1 log<sub>10</sub> CFU/g. Ovi rezultati su slični rezultatima drugih autora koji nalaze da je kupus dobra osnova za razviće *L. monocytogenes* (Sant'Ana et al., 2012). Ovo se može objasniti prisustvom većih količina fermentabilnih šećera od kojih je najzastupljenija glukoza koju *L. monocytogenes* veoma lako može da koristi u ishrani (Beuchat et al., 1986; Dogbe, 2010).

Eksperimentalni rezultati pokazuju da se *L. monocytogenes* ATCC 19115 nije mogla detektovati u uzorcima šargarepe nakon četiri dana skladištenja, dok se soj *L. monocytogenes* ATCC 19112 u uzorcima šargarepe nije mogao detektovati nakon sedam dana skladištenja. Ovakvi rezultati ukazuju da sečena šargarepa ispoljava antimikrobnu aktivnost na rast oba bakterijska soja, što je u skladu sa rezultatima drugih autora.

Beuchat i Brackett (1990 a) su ispitivali opstanak dva soja *L. monocytogenes* na sveže sečenoj i kuvanoj šargarepi na temperaturi od 5 i 15°C. Uočeno je da se brojnost populacije ne može detektovati kod sveže šargarepe, na obe ispitivane temperature. Kod kuvane šargarepe, ovakav antilisterijski efekat nije uočen, što ukazuje na to da ovaj efekat potiče od termolabilnih komponenata koje su prisutne samo u svežem soku šargarepe. Prema rezultatima istog autora, prisustvom svežeg soka od šargarepe u triptoznom fosfatnom bujonu, u koncentracijama od 1%, ostvareno je maksimalno smanjenje brojnosti populacije *L. monocytogenes* već za 24h na temperaturi od 30°C. Nguyen-The i Lund (1991) takođe su ispitivali antilisterijski efekat sveže rendane i sečene šargarepe. Ovi autori

uočavaju veoma brzo opadanje početnog broja *Listeria* u šargarepi koja je skladištena na temperaturi od 8°C. Antilisterijski efekat je ispoljilo pet sorti šargarepe, međutim posle nedelju dana skladištenja, veoma brzo dolazi do povećanja brojnosti *L. monocytogenes*. Prema Harris i sar., (2003) antilisterijski efekat soka od šargarepe pripisuje se fitoaleksinu. Fitoaleksini su toksične antimikrobne supstance male molekulske težine koje nastaju u biljkama posle napada patogena ili usled hemijskih i mehaničkih oštećenja. Stvaraju ih zdrave ćelije koje se nalaze u blizini oštećenih ili nekrotiranih, pri čemu taj proces indukuje materije koje difunduju iz napadnutih ćelija. Otpornost se javlja kada jedan ili više fitoaleksina dostigne dovoljnu koncentraciju da ograniči razvoj patogena. Većina poznatih fitoaleksina je mikotoksična, a neki su toksični i za bakterije. Sintezu fitoaleksina izazivaju fitoaleksin-elicitori. To su termolabilna jedinjenja velike molekulske mase, a nastaju degradacijom ćelijskog zida biljke (Agrios, 1997).

Eksperimentalni podaci pokazuju da dodatak šargarepe u koncentracijama od 50% ili 70% u kupus, značajno smanjuje prosečan broj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u kupusu. Kod soja *L. monocytogenes* ATCC 19112 dodatak šargarepe u koncentraciji od 50% u kupus izaziva smanjenje brojnosti populacije za period od šest dana od 3 log<sub>10</sub> CFU/g u poređenju sa uzorkom samog kupusa. Kod oba bakterijska soja je uočeno da sve upotrebljene mešavine kupusa i šargarepe ispoljavaju antimikrobnu aktivnost u poređenju sa samim kupusom.

Sveže sečana crna rotkva predstavlja najnepovoljniji supstrat za razviće ispitivanih bakterija. Eksperimentalni podaci pokazuju da se soj *L. monocytogenes* ATCC 19115 u rotkvi nije više mogao detektovati, nakon četvrtog dana skladištenja. Soj *L. monocytogenes* ATCC 19112 nije se mogao detektovati u rotkvi nakon petog dana skladištenja. Dodatak crne rotkve šargarepi, omogućio je brže i efikasnije odumiranje oba ispitivana bakterijska soja, u poređenju sa čistom šargarepom.

### **6.3. Antimikrobna aktivnost omotača hitozana na rast *L. monocytogenes* u povrću**

Eksperimentalni rezultati su pokazali da sve upotrebljene formulacije hitozana imaju potencijal da inhibiraju razviće ispitivanih bakterijskih sojeva u povrću ukoliko su primenjene u obliku omotača. Pri tom je najizraženija inhibitorna aktivnost uočena kod

omotača koji su pripremljeni sa sirćetnom kiselinom i hitozanom u koncentraciji od 1%. U zavisnosti od vrste povrća na kojoj su omotači hitozana primenjeni, zabeležena je već u toku prvog dana inhibicija početnog broja *L. monocytogenes* ATCC 19115 od 3,1 log<sub>10</sub> CFU/g kod crne rotkve, 3,2 log<sub>10</sub> CFU/g kod šargarepe odnosno 3 log<sub>10</sub> CFU/g kod kupusa. Za *L. monocytogenes* ATCC 19112, 1% omotači hitozana pripremljeni sa dodatkom sirćetne kiseline, ostvarili su inhibiciju početnog broja bakterija od 2,8 log<sub>10</sub> CFU/g kod svih ispitivanih vrsta sečenog povrća.

Uočena antimikrobna aktivnost omotača hitozana na *L. monocytogenes* nije novina. Hitozan i njegovi derivati bili su ranije prepoznati kao antimikrobni agensi (Bordenave et al., 2010; Kanatt et al., 2013;).

Aktivnost hitozana uprkos tome što nije u potpunosti rasvetljena, može se objasniti promenama u ćelijskoj propustljivosti, interakcijom između amino grupa hitozana i elektronegativnog naelektrisanja na površini ćelije što dovodi do curenja unutarćelijskih elektrolita i proteina (Muzzarelli et al., 1990; Rabea et al., 2003). Osim toga, kod nekih gljiva hitozan može proizvesti poremećaj funkcija membrane interakcijom sa elektronegativnom površinom mikroorganizama, što dovodi do promena u propustljivosti, poremećaja metabolizma i na kraju do smrti (Fang et al., 1994). Prema Brodelius et al. (1989) visoke koncentracije hitozana mogu izazvati smrt ćelije, usled permeabilizacije membrane.

Durango et al. (2006) su ispitivali jestive premaze hitozana i skroba u cilju određivanja njihove antimikrobne sposobnosti na kolutićima šargarepe. Pripremljena šargarepa je potapana u film hitozana i skroba i skladištena na 15°C. U pripremljenim uzorcima određen je ukupan broj mezofilnih aerobnih bakterija, koliformnih bakterija, *E. coli*, *S. aureus*, kvasaca, gljiva i bakterija mlečne kiseline. Prema podacima ovih autora, omotači sa 0,5% hitozana imaju sposobnost da kontrolišu rast mezofilnih aerobnih vrsta, kvasaca i gljiva samo u toku prvih pet dana skladištenja. Omotači sa 1,5% hitozanom ispoljavaju smanjenje mezofilnih aerobnih vrsta, kvasaca i gljiva za 1,34 odnosno 2,5 logaritamska ciklusa u odnosu na kontrolu koja nije bila tretirana jestivim premazom. Sa druge strane, ukupan broj bakterija mlečne kiseline je inhibiran sa primenjenom koncentracijom od 1,5% hitozana na osnovu čega ovi autori preporučuju jestive premaze od



hitozana i skroba kao alternativu za kontrolu mikrobiološke aktivnosti u minimalno prerađenom povrću.

Prema podacima Sánchez-González et al. (2011), jestivi omotači dobijeni od hitozana sa ili bez dodatog etarskog ulja bergamota predstavljaju dobru alternativu za čuvanje grožđa, sprečavanje gubitka težine i očuvanje čvrstine ploda tokom skladištenja.

Proučavanjem antimikrobne aktivnosti omotača hitozana uz dodatak etarskog ulja mandarine na rast *L. innocua* u boraniji, Severino et al. (2014) uočavaju da se kod uzoraka koji su tretirani hitozanom već u toku prvog dana skladištenja moglo uočiti smanjenje početnog broja bakterija od 2 log u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Osim toga, antimikrobni efekat omotača hitozana obogaćenog etarskim uljem pokazuje snažnu antimikrobnu aktivnost na *L. innocua* u toku 15 dana skladištenja što je rezultovalo u smanjenju brojnosti bakterijske populacije od 4 log u poređenju sa kontrolnim uzorkom koji nije tretiran hitozanom.

Dobijeni rezultati pokazuju da kod upotrebe 0,25% hitozana kao omotača, kod sveže sečenog kupusa i šargarepe dolazi do povećanja brojnosti obe ispitivane populacije već nakon 48h. Kod omotača pripremljenih sa 0,5% hitozanom, porast ispitivanih bakterijskih vrsta uočen je u uzorcima kupusa i šargarepe nakon 72h. Ova činjenica ukazuje na to da postoji bakteriostatički efekat primenjenog tretmana, verovatno zbog subletalnog oštećenja bakterijskih ćelija koji uzrokuje da bakterije ne mogu da se razvijaju tokom skladištenja. Dobijeni rezultati ispitivanja mogu se tumačiti i kao opadanje antimikrobne aktivnosti hitozana tokom vremena. Ovakve osobine omotača na bazi hitozana su uočene od strane drugih autora i objašnjene su opadanjem njegove antimikrobne aktivnosti, koja nastaje zbog smanjene dostupnosti amino-grupa u molekulu hitozana.

Kod ispitivanja antimikrobne aktivnosti hitozana u vidu omotača na sveže sečenoj rotkvi, uočeno je da sve primenjene koncentracije hitozana ispoljavaju izraženu baktericidnu aktivnost. Naši rezultati pokazuju da se kod ovog povrća, ispitivani bakterijski sojevi nisu mogli detektovati u uzorcima crne rotkve, počevši od prvog dana skladištenja, pa sve do kraja ispitivanja. Ovakvi rezultati se mogu objasniti prisustvom antimikrobnih materija u rotkvi koje su delovale sinergistički sa upotrebljenim hitozanom.

#### **6.4. Antimikrobna aktivnost kompozitnih filmova hitozana i želatina sa dodatkom etarskih ulja na rast *L. monocytogenes* u povrću**

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti kompozitnih filmova na bazi hitozana i želatina su pokazali da sve upotrebljene formulacije hitozana imaju potencijal da inhibiraju razviće ispitivanih bakterijskih sojeva u povrću. Naši rezultati su pokazali da sa povećanjem koncentracije hitozana raste i njegova antimikrobna aktivnost. Međutim, kod oba bakterijska soja je uočeno da 2% film hitozana ispoljava manju antimikrobnu aktivnost nego 1% film.

Osim toga, rezultati istraživanja su pokazali da etarska ulja doprinose povećanju antimikrobne aktivnosti svih upotrebljenih filmova hitozana. Najizraženiju aktivnost su pokazali filmovi sa dodatkom 0,2% etarskog ulja timijana. Ovakav efekat filmova sa etarskim uljima je bio i očekivan jer su rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti samih etarskih ulja pokazali da upravo etarsko ulje timijana ima najizraženiji efekat na ispitivane bakterijske vrste.

Prema podacima Perdones et al. (2012), hitozan obogaćen dodatkom etarskih ulja može sprečiti pojavu sive plesni na jagodama. Istraživanja Vu et al. (2011), takođe su pokazala da jestivi omotači od hitozana sa dodatkom etarskog ulja timijana, limonena i pepermintu mogu biti veoma efikasni u sprečavanju kvarenja jagoda u period od 14 dana, na temperaturi od 4°C.

Ispitivanjem antilisterijskog efekta modifikovanog hitozana sa dodatkom etarskih ulja limuna, mandarine, bergamota ili karvakrola na brokoliju, Severino et al. (2014) nalaze da se najbolji efekat u smanjenju *L. monocytogenes* postiže sa hitozanom pripremljenim sa uljem mandarine.

Takođe i rezultati Chi (2004), pokazuju da primena filma hitozana smanjuje brojnost patogena u salami, od 1 do 3 log. Film hitozana obogaćen dodatkom 1% i 2% etarskog ulja origana omogućio je 4 log redukcije *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7 u komadima salame koji su skladišteni na 10°C tokom 5 dana.

Vasilatos i Savvaidis (2013), su ispitivali antimikrobnu aktivnost hitozana uz dodatak etarskog ulja ruzmarina u koncentraciji od 0,25% (v/w) na rast različitih mikroorganizama na ćurećim filetima. Rezultati ovih autora takođe ukazuju da hitozan

ispoljava snažnu antimikrobnu aktivnost. Samo etarsko ulje ruzmarina ispoljava slabiju antimikrobnu aktivnost od hitozana, dok kombinacija hitozana sa dodatkom etarskog ulja ruzmarina ima najsnažniju antimikrobnu aktivnost što samo ukazuje da etarsko ulje ruzmarina i hitozan u koncentraciji od 1,5% (w/v) ispoljavaju sinergistički efekat na inhibiciju rasta *Lactobacillus* spp., *Br. thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, kvasaca i plesni.

Prema podacima Petrou et al. (2012), hitozan primenjen pojedinačno ili u kombinaciji sa etarskim uljem origana, može produžiti rok trajanja pilećih fileta upakovanih u modifikovanoj atmosferi za 6 odnosno 14 dana.

Kombinacija prirodnih antimikrobnih komponenata kao što su hitozan i etarska ulja, može obezbediti poboljšana antimikrobna svojstva materijala za čuvanje sveže sečenog povrća. Zbog direktnog uticaja dodatih etarskih ulja na senzorne karakteristike hrane, dodatak etarskih ulja u filmove može naći značajnu primenu u pakovanju minimalno prerađenog povrća. Pored izražene antimikrobne aktivnosti i poboljšane bezbednosti upakovanog povrća, upotrebom filmova hitozana sa dodatkom etarskih ulja mogu se postići i ogovarajuća senzorna svojstva upakovanog svežeg proizvoda, naročito po pitanju sprečavanja potamnjenja i formiranja arome.

## **6.5. Antimikrobna aktivnost hitozana u majonezu**

Pojedine vrste salata pored određenih vrsta povrća pripremaju se i uz dodatak manjih ili većih količina majoneza. Majonez usled toga može imati značajan uticaj na sudbinu mikroorganizama u pripremljenim salatama. Eksperimentalni rezultati su pokazali da sve upotrebljene formulacije hitozana imaju potencijal da inhibiraju razviće ispitivanih sojeva *L. monocytogenes* u komercijalnom majonezu. Uočeno je da sam majonez dovodi do brzog propadanja ispitivanih bakterijskih vrsta, na osnovu čega se može reći da sam majonez nije pogodna sredina u kojoj je moguć opstanak *L. monocytogenes*. Dobijeni rezultati pokazuju da se potpuna inhibicija ove bakterijske vrste u majonezu bez dodatog hitozana postiže za četiri dana skladištenja. Dodatak 0,5% hitozana majonezu, omogućava brže odumiranje bakterija pa se potpuna inhibicija *L. monocytogenes* ATCC 19115 u majonezu postiže za tri dana skladištenja. Na osnovu vrednosti korelacionog koeficijenta za

rast *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *L. monocytogenes* ATCC 19112 u majonezu, može se videti da između ispitivanih sojeva postoji jaka pozitivna zavisnost ( $r = 0.99$ ). *L. monocytogenes* ATCC 19112 potpuno je inhibirana u majonezu sa dodatkom 0,5% hitozana za 72 h skladištenja.

Brzo odumiranje ispitivanih sojeva *L. monocytogenes* u komercijalnom majonezu može se objasniti prisustvom sirćetne kiseline koja se koristi u proizvodnji majoneza. Ovakvi rezultati su u skladu sa podacima drugih autora koji pokazuju da pH vrednost i dodatak sirćetne kiseline majonezu utiču na smanjenje broja ćelija *L. monocytogenes* u ovom komercijalnom proizvodu (Glass i Doyle, 1991; Hwang i Tamplin, 2005; Erickson, 2010). Međutim, salate koje se pripremaju od povrća sa dodatkom majoneza mogu da sadrže različite sastojke koji variraju po svom hemijskom sastavu, fizičkim svojstvima i mikrobiološkim karakteristikama. Zbog toga i opstanak patogenih mikroorganizama u salatama sa majonezom može značajno varirati. Rezultati Ericksona (2010), pokazuju da u kupus salati i krompir salati sa dodatkom majoneza, broj *L. monocytogenes* se smanjuje tokom skladištenja dok je u salati sa šunkom zabeleženo povećanje ovih patogenih bakterija.

Deo sirćetne kiseline u majonezu može biti apsorbovan od strane tkiva povrća što može izazvati njeno smanjeno antimikrobno dejstvo (Radford i Board, 1993). Zbog toga bi dodatak hitozana u majonez imao veoma pozitivan efekat na brže postizanje mikrobiološke stabilnosti u salatama sa majonezom.

## **6.6. Uticaj filmova hitozana na pH vrednost povrća**

Rezultati prikazani u ovom poglavlju pokazuju da se pH vrednosti ispitivanog povrća nalaze u intervalu od 6,4 do 6,7. Dobijene vrednosti su u skladu sa rezultatima drugih autora (Barry-Ryan et al. 2007). Kod svih ispitivanih uzoraka sveže sečenog povrća, uočava se smanjenje početne pH vrednosti, tokom skladištenja. Prema podacima Uzeh i Adepoju (2013), ovakve promene pH vrednosti netretiranog povrća, tumače se razvićem mikroorganizama koji stvaraju organske kiseline i izazivaju pogoršanje kvaliteta povrća.

Tokom perioda skladištenja dolazi do značajnog opadanja pH vrednosti povrća koje je skladišteno u prisustvu filmova hitozana. Već nakon prvih 24h skladištenja, ostvareno

smanjenje u uzorcima povrća se kreće u rasponu od 32,8% (kod kupusa) do 22,4% (kod šargarepe). Ukupno ostvareno smanjenje pH u svim vrstama povrća u prisustvu 0,5% hitozana iznosilo je 28,4% (kupus i šargarepa) odnosno 28,2% kod rotkve. U prisustvu 1% hitozana, ukupno smanjenje pH, u odnosu na početnu vrednost iznosilo je 26,9% kod kupusa i šargarepe, odnosno 26,6% kod rotkve. Najmanje smanjenje od 23,9% (kupus i šargarepa) odnosno 23,4% (rotkva), uočeno je kod 2% hitozana. Dobijene vrednosti su približno ujednačene tokom celog ispitivanja, što ukazuje da filmovi hitozana mogu imati uticaj na minimiziranje ovih promena u uskladištenom povrću. Slične zaključke izneli su i Wardy et al. (2014), koji ističu da omotači hitozana mogu smanjiti promene pH kod belanca jajeta. Takođe i rezultati Di Pierro et al. (2011) pokazuju da se nakon primene filmova hitozana u Ricotta siru uočava naglo smanjenje pH vrednosti koja ostaje konstantna tokom 30 dana skladištenja.

Dobijeni rezultati ukazuju da sirćetna kiselina koja je prisutna u filmovima, difunduje u povrće i izaziva smanjenje njegove pH vrednosti. Difuzija kiseline iz filmova je najizraženija na početku ispitivanja, usled čega je najveći pad pH vrednosti u povrću registrovan u toku prvih 24h skladištenja. Ispitivanjem kinetike oslobađanja organskih kiselina iz filmova hitozana, Ouattara i Simard (2000) su utvrdili da je difuzija kiseline u vodeni rastvor najbrža na početku i da postepeno opada. Teorijski, ovi autori objašnjavaju prelazak sirćetne kiseline iz filma hitozana, prodiranjem vode u matriks hitozana, rastvaranjem kiseline i njenim oslobađanjem. Međutim, situacija je mnogo kompleksnija jer pri tom dolazi do brojnih interakcija između polimera i tečnosti. Najveća promena pH vrednosti povrća je utvrđena kod filmova koji sadrže manje koncentracije hitozana. Ovakve promene mogu biti objašnjene većim viskozitetom hitozana koji je uočen kod većih koncentracija hitozana.

Osim toga, rezultati ukazuju da sirćetna kiselina iz filmova hitozana može značajno uticati na formiranje prihvatljivijeg ukusa povrća ali i da može poboljšati antimikrobnu aktivnost hitozana. Nekoliko autora je pokazalo da antimikrobna aktivnost filmova hitozana raste sa opadanjem pH (Mohy Eldin, 2008; Aider, 2010). Rhoades i Roller (2000), ovakav efekat smatraju sinergističkim jer kiseline stvaraju jači stres na bakterijske ćelije.

## 6.7. Senzorna analiza

Sveže sečeno povrće mora imati atraktivan izgled, prihvatljivu aromu, karakterističnu boju i konzistenciju, kako bi privuklo potencijalne potrošače. Potrošači mogu probati novi proizvod samo ukoliko ih on privlači svojim izgledom, ili odustati od njega ukoliko ne ispoljava specifična senzorna svojstva (Barrett et al., 2010). Rezultati senzorne analize pokazuju da su senzorne karakteristike povrća odmah nakon primene filmova hitozana bile tipične za određenu vrstu povrća. Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da primenjeni filmovi hitozana poboljšavaju senzorne karakteristike sveže sečenog povrća. Kod 0,5% filma hitozana nije registrovana nikakva promena boje kod uzoraka rotkve i šargarepe. Osim toga, svi uzorci povrća koji su skladišteni u prisustvu hitozana imali su prihvatljiviji ukus i miris. Rezultati senzornih analiza drugih autora su potpuno različiti. Prema rezultatima Di Pierro et al. (2011) primena hitozan filmova kod Ricotta sira nije značajno uticala na izgled, ukus i miris ovog proizvoda. Sa druge strane, upotreba filmova hitozana može doprineti poboljšanju kvaliteta kriški tikvica (Ponce et al., 2008) ili ličija (Dong et al., 2003). Međutim, rezultati senzorne analize Vargas et al. (2006), pokazali su da primenjeni omotači hitozana umanjuju kvalitet svežih jagoda jer izazivaju promenu ukusa i pojavu adstrigencije.

Dodatak etarskih ulja filmovima hitozana, ima opravdanja zbog postizanja izraženijeg ukusa i mirisa. Rezultati senzorne analize su pokazali da se filmovi sa etarskim uljem mente veoma povoljno odražavaju na miris i ukus svih ispitivanih vrsta povrća, a naročito kupusa. Dodatak timijana ocenjen je kao potpuno neprihvatljiv, bez obzira na vrstu povrća koje je analizirano. U literaturi se može naći određen broj podataka o primeni etarskih ulja u hrani, koja su zasnovana na njihovim aromatičnim i antimikrobnim svojstvima (Sánchez-González et al., 2011; Petrou et al., 2012; Perdonés et al., 2012). Međutim, treba istaći da primena etarskih ulja u hrani zahteva obaveznu senzornu procenu u modelima hrane koji su približni sastavu hrane u kojoj će se oni primenjivati. Ovo je neophodno pre svega zbog različitog slaganja sastojaka hrane i etarskih ulja, kao i njihove moguće reakcije.

## ZAKLJUČCI

Na osnovu izvršenih ispitivanja i prikazanih rezultata mogu se izneti sledeći zaključci:

1. Sve ispitivane vrste etarskih ulja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost na rast oba ispitivana soja *L. monocytogenes*. Najsnažniju antimikrobnu aktivnost na oba ispitivana soja ispoljilo je etarsko ulje timijana. Najslabiju aktivnost na oba ispitivana soja ispoljilo je etarsko ulje peršuna. Između ispitivanih sojeva ne postoji značajna razlika u osetljivosti prema etarskom ulju peršuna i timijana.
2. Sve ispitivane mešavine etarskih ulja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost na rast oba ispitivana soja. Najsnažnije dejstvo, na oba ispitivana soja, ispoljile su mešavine koje sadrže etarsko ulje timijana. Dodatak ostalih etarskih ulja, smanjuje antimikrobnu aktivnost etarskog ulja timijana. Za soj *L. monocytogenes* ATCC 19112 procenat smanjenja zona inhibicije za mešavinu timijan-ruzmarin iznosi 57,8%, u odnosu na etarsko ulje timijana.
3. Kupus kao povrće predstavlja veoma pogodan supstrat za razviće oba ispitivana soja bakterija. Šargarepa i crna rotkva ispoljavaju inhibitorni efekat na razviće ispitivanih sojeva bakterija jer utiču na brzo smanjenje brojnosti njihovih populacija. Najsnažnije inhibitorno dejstvo na rast ispitivanih sojeva imala je crna rotkva. Između ispitivanih sojeva postoji statistički značajna razlika u ponašanju ovih bakterija na svim ispitivanim vrstama povrća, na temperaturi od 4°C.
4. Dodatak šargarepe sveže sečenom kupusu, u toku šest dana, može značajno smanjiti brojnost oba ispitivana soja *L. monocytogenes*. Veća inhibicija postiže se sa većim upotrebljenim koncentracijama šargarepe. Pri tom, dodatak šargarepe kupusu u koncentracijama od 50% ili 70% doprinosi značajnom smanjenju oba ispitivana bakterijska soja.
5. Sama crna rotkva ispoljava snažnu antimikrobnu aktivnost na oba ispitivana bakterijska soja, izazivajući potpunu inhibiciju soja *L. monocytogenes* ATCC 19115 za četiri dana, odnosno *L. monocytogenes* ATCC 19112 za pet dana. Dodatak sečene crne rotkve šargarepi, takođe ispoljava snažnu antimikrobnu aktivnost na oba ispitivana soja *L. monocytogenes*, u svim primenjenim koncentracijama.

6. Uspešnost primene hitozana u obliku omotača za čuvanje sveže sečenog povrća zavisi od koncentracije hitozana, vrste povrća i vrste kiseline koja je upotrebljena za rastvaranje hitozana. Kod sveže sečene rotkve, sve upotrebljene koncentracije omotača hitozana imale su efikasno dejstvo na inhibiciju ispitivanih sojeva tokom pet dana skladištenja na temperaturi od 4°C.

Kod sveže sečene šargarepe, inhibicija oba ispitivana soja postignuta je samo sa 1% omotačem hitozana tokom pet dana skladištenja na temperaturi od 4°C. Ostale koncentracije hitozana imale su slabiji efekat na rast ispitivanih sojeva bakterija.

Za čuvanje sveže sečenog kupusa, upotrebljene koncentracije hitozana nisu bile efikasne. Omotači hitozana koji su pripremljeni uz upotrebu sirćetne kiseline kao rastvarača imaju snažnije dejstvo na ispitivane sojeve bakterija, od omotača hitozana iste koncentracije koji su pripremljeni sa mlečnom kiselinom.

7. Antimikrobna aktivnost kompozitnih filmova hitozana zavisi od koncentracije hitozana. Veće koncentracije hitozana ispoljavaju veću antimikrobnu aktivnost; kompozitni film 1% hitozana je efikasniji od 0,5% kompozitnog filma hitozana međutim 2% kompozitni film hitozana ima manju efikasnost od 1% kompozitnog filma hitozana. Ovakvi rezultati mogu se obrazložiti visokim viskozitetom 2% filma hitozana.
8. Postoji značajna razlika u ostvarenoj inhibiciji ispitivanih sojeva bakterija na različitim vrstama povrća sa istim koncentracijama kompozitnih filmova hitozana. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da vrsta povrća i njen hemijski sastav mogu značajno uticati na antimikrobnu aktivnost kompozitnih filmova.
9. Na osnovu ponašanja ispitivanih sojeva *L. monocytogenes* u komercijalnom majonezu sa dodatkom hitozana može se zaključiti da primena hitozana uspešno može eliminisati prisustvo ovih bakterija u gotovim salatama, u slučaju kada bi se u pripremi proizvoda koristilo povrće koje je kontaminirano malim količinama *L. monocytogenes*.
10. Upotreba hitozana u majonezu u cilju sprečavanja razvića *L. monocytogenes* zavisi od upotrebljene koncentracije hitozana. Veće koncentracije efikasnije utiču na



odumiranje ispitivanih bakterija u majonezu. Između ispitivanih bakterijskih sojeva postoji statistički značajna razlika u majonezu, u prisustvu hitozana.

11. Pored antimikrobne aktivnosti, filmovi hitozana uslovljavaju značajnu promenu pH vrednosti uskladištenog povrća. Najveća promena je zabeležena nakon prvih 24h skladištenja, u uzorcima kupusa koji su skladišteni u prisustvu 0,5% hitozana (od 32,8%) dok je najmanja promena pH (od 22,4%) uočena kod uzoraka šargarepe koji su skladišteni u prisustvu 2% hitozana. Ne postoji značajna razlika između uzoraka koji su skladišteni u prisustvu filmova sa različitim koncentracijama hitozana.
12. Rezultati senzorne analize pokazuju da ukupna promena senzornih karakteristika tokom četiri dana skladištenja zavisi od vrste povrća i primenjenog tretmana (koncentracija hitozana i etarskih ulja). Ukupna promena boje šargarepe tokom četiri dana skladištenja u prisustvu filmova hitozana, računata u odnosu na sveže pripremljen uzorak povrća, pokazuje najmanje odstupanje kod svih uzoraka šargarepe, skladištenih u prisustvu hitozana. Kod rotkve nije uočena značajna promena boje u prisustvu 0,5% filma hitozana, tokom četiri dana skladištenja, dok je značajna razlika konstatovana kod netretiranih uzoraka rotkve i onih koji su skladišteni u prisustvu 1% hitozana. Kod uzoraka kupusa utvrđena je značajna razlika u ukupnoj promeni boje, tokom četiri dana skladištenja kod svih uzoraka kupusa, u odnosu na sveže pripremljen uzorak.
13. Kod svih vrsta povrća, najveće promene senzornih karakteristika (ukusa i mirisa), konstatovane su u uzorcima koji su skladišteni u prisustvu filmova sa etarskim uljem timijana. Bez obzira na upotrebljene koncentracije timijana, svi uzorci povrća koji su skladišteni u prisustvu ovih filmova bili su neprihvatljivi za potrošače.
14. Konstatovano je da svi uzorci povrća koji su skladišteni u prisustvu 0,5% i 1% filmova hitozana, ispoljavaju poboljšanje ukusa i mirisa, usled čega su rado prihvaćeni od strane ocenjivača.
15. Generalno se može zaključiti da filmovi hitozana mogu doprineti postizanju zdravstvene ispravnosti sveže sečenog povrća i sprečavanju pojave *L. monocytogenes* u njima. Upotrebom ovih filmova, takođe se postiže i poboljšanje organoleptičkih svojstava minimalno prerađenog, sveže sečenog povrća.

## LITERATURA

1. Abd, A.J., Niamah, A.K. (2012): Effect of chitosan on apple juice quality. *International journal of agriculture and food science*, 2 (4): 153-157.
2. Abdou, I.A. (1972): Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qualitas plantarum*, 21: 29-35.
3. Abdulaali, N.I. (2009): Effect of Carrot Extracts on *Pseudomonas aeruginosa*. *Pakistan journal of nutrition*, 8 (4): 373-376.
4. Achet, D., He, X.W. (1995): Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer*, 36: 787-791.
5. Acosta, N., Jimenez, C., Borau, V., Heras, A. (1993): Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass bioenergy*, 5 (2):145-53.
6. Agrios, G. N. (1997): How plants defend themselves against pathogens. In *Plant Pathology*. Ed. Academic Press. USA. pp: 93-114.
7. Ahmed, A. A., Bishr, M.M., El-Shanawany, M.A., Attia, E.Z., Ross, S.A. and Pare, P.W. (2005): Rare Trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild daucus carota. *Phytochemistry*, 66: 1680-1684.
8. Aider, M. (2010): Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food science and technology*, 43: 837-842.
9. Al-Bayati, F.A. (2008): Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 116: 403-406.
10. Al-Hassan, A. A., Norziah M. H. (2012): Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food hydrocolloids*, 26 (1): 108-117
11. Allerberger, F. (2003): *Listeria*: Growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology, *FEMS Immunology and medical microbiology*, 35: 183-189.

12. Andres, Y., Giraud, L., Gerente, C. & Le Cloirec, P. (2007): Environmental technology, 28: 1357-1363
13. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. (2006): Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. Journal of agricultural and food chemistry, 54: 4364–4370.
14. Anonymous. (1993): Biodegradable polymers forge ahead. BioCycle, 34 (9): 72-74
15. Anonymous. (2009). <http://www.ars.usda.gov>
16. Anonymous. (2012). <http://www.herbaextractsplus.com/black-radish.html>
17. Anonymous. (2014). <http://www.carrotmuseum.co.uk/eatmorepdf.pdf>
18. Annous, B.A., Beckerel, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J. (1997): Critical role of anteiso C<sub>15:0</sub> fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. Applied and environmental microbiology, 63 (10): 3887-3894
19. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. (2009): Functional characterization of chitin and chitosan. Current chemical biology, 3: 203-230.
20. Arizona Center for integrative Medicine. (2010): Phytochemicals and your health, University of Arizona
21. Aureli, P., Constantini, A., Zolea, S. (1992): Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. Journal of food protection, 55: 344-348.
22. Avena-Bustillos, R.J., Cisneros-Zevallos, L.A., Krochta, J.M., and Saltveit, M.E. (1994): Application of casein-lipid edible film emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots. Postharvest biology and technology 4: 319-329.
23. Aytac, S.A., Gorris, L.G.M. (1994): Survival of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under moderate vacuum. World journal of microbiology and biotechnology, 10: 670-672.
24. Bai, J.H., Saftner, R.A., Watada, A.E., and Lee, S.Y. (2001): Modified atmosphere maintains quality of fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo* L.). Journal of food science, 66 (8): 1207-1211.

25. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. *Food and chemical toxicology*, 46: 446-475.
26. Baldwin, E.A., Nisperos, M.O., Chen, X., Hagenmaier, R.D. (1996): Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest biology and technology*, 9 (2): 151-163.
27. Baldwin, E.A. (1999): Surface treatments and edible coatings in food preservation, *Handbook of food preservation*, Second Edition, pp. 478-498
28. 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.
29. Barrett, D.M., Beaulieu, J.C., Shewfelt, R. (2010): Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: Desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50: 369–389.
30. Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A., Rico, D., Barat, J. (2007): Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in food science and technology*, 18: 373-386.
31. Bartz, J., Showalter, R. K. (1981): Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. *Phytopathology*, 71: 515–518.
32. Bauer, A.W, Kirby, W.M.M, Sherris, J.C., Turck, M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45:493-6.
33. Beales, N. (2004): Adaptation of microorganism to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, vol. 3.
34. Beaulieu, J. C. Lea, J. M. (2007): Quality changes in cantaloupe during growth, maturation, and in stored fresh-cuts prepared from fruit harvested at various maturities. *Journal of the American society for horticultural science*, 132 (5): 720–728.

35. Becton, Dickinson and Company (2003): Difco & Manual, manual of microbiological culture media
36. Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J.E. (2012): Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of food engineering*, 110: 232–239.
37. Bendiabdellah, A., Mohammed El Amine Dib, Djabou, N., Allali, H., Tabti, B., Muselli, A. i Costa J. (2012): Biological activities and volatile constituents of *Daucus muricatus* L. from Algeria. *Chemistry central journal*, 6: 48
38. Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., Meile, L. (2013): *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 526-532.
39. Beuchat, L.R, Brackett, R.E, Hao, D.Y-Y, Conner, D.E. (1986): Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Canadian journal of microbiology*, 32: 791-795.
40. Beuchat, L.R. (1996): *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Journal of food control*, 7: 223-228.
41. Beuchat, L.R. (1996 a): Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of food protection*, 59: 204-216.
42. Beuchat, L.R. (1998): Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. WHO/FSF/FOS 98.2
43. Beuchat, L.R, Brackett, R.E. (1990): Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere and temperature. *Journal of food science*, 55: 755-758, 870.
44. Beuchat, L.R., Brackett, R.E. (1990 a): Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 56(6): 1734–1742.
45. Beuchat, L.R, Brackett, R.E. (1991): Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Applied and environmental microbiology*, 57: 1367-1371.
46. Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J. M., Rogers, A. E., Saurat, J. H., Sipes, I. G., Smith, R. L., Tagami, H. (2005): A toxicologic and dermatologic assessment of

- cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food and chemical toxicology*, 43: 799-836.
47. Bihari-Varga, M., Sepulchre, C., Moczar, E. (1975): Thermoanalytical studies on protein-polysaccharide complexes of connective tissues. *Journal of thermal analysis*, 7: 675-683.
  48. Biniam, G., Mogessie, A. (2010): Microbial load, prevalence and antibiograms of *Salmonella* and *Shigella* in lettuce and green peppers. *Ethiopian journal of health sciences*, 20 (1): 41-48.
  49. Bof, M.J., Bordagaray, V.C., Locaso, D.E., García, M.A. (2015): Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food hydrocolloids*, 51: 281-294
  50. Bogue, R.H. (1922): *The chemistry and technology of gelatin and glue*, McGraw Hill, New York.
  51. Boileau, T.W., Liao, Z., Kim, S., Lemeshow, S., Erdman, J.W., Clinton, S.K. (2003): Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene or energy-restricted diets. *Journal of the national cancer institute*, 95: 1578-1586.
  52. Bokura, H., Kobayashi, S. (2003): Chitosan decreases total cholesterol in women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European journal of clinical nutrition*, 57: 721–725.
  53. 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.
  54. Bordenave, N., Grelier, S., Coma, V. (2010): Hydrophobization and antimicrobial activity of chitosan and paper-based packaging material. *Biomacromolecules*, 11:88–96.
  55. Boucinha Teixeira, B.P. (2013): *Substâncias naturais e processamento por alta pressão para conservar robalo*. Universidade de Aveiro.
  56. Brodelius P, Funk C, Haner A, Villegas M. (1989): A procedure for the determination of optimal chitosan concentrations for elicitation of cultures plant cells. *Phytochemistry*, 28: 2651-2654.

57. Brown, M.H., Booth, I.R. (1991): Acidulants and low pH In: Russell N.J., Gould G.W, editors *Food preservatives* Glasgow U.K.: Blackie P. 22-43.
58. Bubonja, M., Vučković, D., Rubeša-Mihaljević, R., Abram, M. (2007): Činitelji bakterije i domaćina u patogenezi listerioze. *Medicina*, 43:15-20.
59. Buchanan, R.L, Stahl, H.G, Whiting, R.C. (1989): Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 52 (12): 844-851.
60. Burkatovskaya, M., Tegos, G.P., Swietlik, E., Demidova, T.N., Castano, A.P., Hamblin, M.R. (2006): Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials*, 27 (22): 4157–4164.
61. Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International journal of food microbiology*, 94: 223–253.
62. Caceres, A. (1987): Screening on antimicrobial activity of plants popular in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases, *Journal of ethnopharmacology*, 20: 223-237.
63. Campos, D. T., Marks, B. P., Vorst, K. L., Keskinen, L. E., Yan, Z., Zhang, Y., Sirmeyer, P., Ryser, E. T. (2009): Accounting for product residue effects when modeling bacterial transfer between processing equipment and meat products. IAFP 96th Annual Meeting, p. 3 (Abst. P1-01).
64. Cao, N., Yang, X., Fu, Y. (2009): Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food hydrocolloids*, 23: 729–735.
65. Oguwike, F.N., Offor, C.C., Nwadihoha, A.N, Ebede, S.O. (2014). Evaluation of efficacy of cabbage juice (*Brassica oleracea* Linne) as potential antiulcer agent and its effect on the haemostatic mechanism of male albino wistar rats. *IOSR Journal of dental and medical sciences*, 13 (1): 92 -97.
66. Çaykara, T., Alaslan, A., Eroğlu, M.S., Güven, O. (2006): *Applied Surface Science*. 252:7430-7435.

67. CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2011): Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe—United States, August–September 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011; 60:1357–8.
68. CDC a. <http://www.cdc.gov/national-surveillance/listeria-surveillance.html>
69. CDC b. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html>
70. Ceylan, E., Fung, D.Y.C. (2004): Antimicrobial activity of spices. *Journal of rapid methods and automation in microbiology*, 12 (1): 1-55.
71. Cha, D.S., Chinnan, M.S. (2004): Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical review of food science and nutrition*, 44: 223–237.
72. Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B.P., Guha, A.K. (2004): Clarification of fruit juice with chitosan. *Process biochemistry*, 39 (12): 2229–2232.
73. Cheah, L.H., Page, B.B.C., Shepherd, R. (1997): Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots. *New Zealand Journal of crop and horticultural science*, 25: 89-92.
74. Chen, X.H., Campbell, C.A., Grant, L.A., Li, P., Barth, M. (1996): Effect of Nature Seal on maintaining carotene in fresh-cut carrots. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, 109: 258-259.
75. Cheng, S.Y., Wang, B.J., Weng, Y.M. (2015): Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *LWT - Food science and technology*, 63 (1): 115-121.
76. Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. (1985): Amino acids, peptides, and proteins. In *Food Chemistry*; Fennema, O.R., Ed.; Dekker: New York.
77. Chi, Shuang. (2004): Development and Characterization of Antimicrobial Food Coatings Based on Chitosan and Essential Oils. Master's Thesis, University of Tennessee. [http://trace.tennessee.edu/utk\\_gradthes/1898](http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/1898)
78. Chung, Y.C., Wang, H.L., Chen, Y.M., Li, S.L. (2003): Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource technology*, 88(3): 179–184.



79. Chunmeng, S., Ying, Z., Xinze, R., Meng Wang, Yongping Su, Tianmin Cheng. (2006): Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of surgical research*, 133 (2): 185–192.
80. Cocchiara, J., Letizia, C. S., Lalko, J., Lapczynski, A., Api, A. M. (2005): Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food and chemical toxicology*, 43: 867-923.
81. Coma, V., Deschamps, A. and Martial-Gros, A. (2003): Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants, *Journal of food science*, 68: 2788-2792.
82. 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.
83. Connor, D.E., Brackett, R.E. Beuchat, L.R. (1986): Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Applied and environmental microbiology*, 52: 59-63.
84. Crous, M. (2011): Effect of irrigation intervals and processing on the survival of *Listeria monocytogenes* on spray irrigated broccoli, MSc Dissertation, University of Pretoria.
85. Cuero, R.G., Osuji, G., Washington, A. (1991): N-carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: Role of Zinc' in *Biotechnology Letters*, 13: 441 – 444.
86. Cuppett, S.L. (1994): Edible coatings as carriers of food additives, fungicides and natural antagonists. in *Edible films and coatings to improve food quality*, eds., J.M. Krochta, E.A. Baldwin and M. Nisperos-Carriedo, Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., Inc., pp. 121–137.
87. Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S. (1998): Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal chemistry*, 75: 1–9.
88. Deters, A., Peterleit, F., Schmidgall, J., Hensel, A. (2008): N-Acetyl-Dglucosamine oligosaccharides induce mucin secretion from colonic tissue and induce differentiation of human keratinocytes. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 60: 1-8.

89. Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004): Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food microbiology*, 21 (6): 703–714.
90. Deza, M.A., Araujo, M., Garnido, M.J. (2003): Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolysed water. *Letters in applied microbiology*, 37: 482-487.
91. Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Masi, P., Porta, R. (2007): Transglutaminase-catalyzed preparation of chitosan-ovalbumin films. *Enzyme and microbial technology*, 40 (3): 437-441.
92. Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L., Porta, R. (2010): Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food science and technology*, doi: 10.1016/j.lwt.2010.11.031.
93. Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, Giosafatto, C.V.L. (2011): Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food science and technology*, 44: 2324-2327.
94. Dogbe, E.E. (2010): Risk of *Listeria monocytogenes* ingestion in consuming coleslaw purchased from food vendors in the Accra metropolis, University of Ghana.
95. Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K., Jiang, Y. (2003): Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *Journal of food engineering*, 64: 355–358.
96. Downes, F.P., Ito, K. (2001): Compendium of methods for examination of foods, fourth edition, E.T. Ryser and C. W. Donnelly: *Listeria*, chapter 36.
97. Doyle, M.E. (1999): Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention, FRI briefings, Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison.
98. Duduk, N., Obradović, A., Ivanović, M. (2010): Uticaj etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na porast micelije *Colletotrichum acutatum*. *Pesticidi i fitomedicina*, 25 (2): 151-156.

99. Dukić, N.M., Bozin, B., Soković M., Mihajlović, B., Matavulj, M. (2003): Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, 69 (5): 413-9.
100. Durango, A.M., Soares, N.F.F, Andrade, N.J. (2006): Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food control*, 17 (5): 336–341.
101. Dutta, P.K., Dutta, J, Tripathi, V.S. (2004): Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of scientific and industrial research*, 63: 20-31.
102. Dutta, P. K.; Tripath, S.; Mehrotra, G. K., Dutta, J. (2009): Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food chemistry*, 114: 1173-1182.
103. Eastoe, J.E., Leach, A.A. (1977): *The science and technology of gelatin*. Academic Press, Inc., New York, 73-107.
104. EC (2002). European Commission (2002): Regulation No. 178/2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European food safety authority and laying down procedures in matters of food safety, *Official Journal, L Series* 031, p1, 01/02/2002, Brussels.
105. EC (2004). European Union (2004): Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs *Official Journal, L series* 226, p3, 25/06/2004, Brussels.
106. EC (2005): Commission Regulation on Microbiological Criteria for Foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.
107. Edris, A. E. (2007): Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A Review. *Phytotherapy research*. 21 (4): 308-23.
108. EFSA (2013): EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. *EFSA Journal* 2013, 11 (4): 3129.
109. El Ghaouth, A, Arul, J., Ponnampalam, R., Boulet, M. (1992): Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *Horticulture science*, 27 (9): 1016-1018.

110. El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., Benhamou, N. (1992 a): Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: Induction of morphological and cytological alterations an rhizopus stolonifer. *Mycological research*, 96: 769 – 779.
111. Embuscado, M., Huber, K.C. (2009): *Edible films and coatings for food applications*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 230.
112. Erickson, M.C. (2010): Microbial risks associated with cabbage, carrots, celery, onions, and deli salads made with these produce items. *Comprehensive reviews in food science and fFood safety*, 9: 602-619.
113. Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F. Venancio, F. Tavares, R. Brito, J.C. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2003): Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in applied microbiology*, 36: 35–40.
114. Fang, S.W., Li, C.F., Shih, D.Y.C. (1994): Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of food protection*, 56: 136-140.
115. Faria, E.V., Yotsuyanagi, K. (2002): *Sensory Analysis Techniques*. ITAL/LAFISE, Campinas, SP. p116.
116. FDA (2014): <http://www.about-listeria.com>
117. Ferreira, C.O., Nunes, C.A., Delgadillo, I., Lopes-da-Silva, J.A. (2009): Characterization of chitosan-whey films at acid pH. *Food research international*, 42:807-813.
118. Feskanich, D., Ziegler, R.G., Michaud, D.S., Giovannucci, E.L., Speizer, F.E., Willett, W.C., Colditz, G.A. (2000): Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *Journal of the national cancer institute*, 92 (22): 1812-1823.
119. Finch, C.A., Jobling, A. (1977): in *The science and technology of gelatin*, A.G. Ward and A. Courts, eds., pp. 258-260, Academic Press, London.
120. Francis, G.A., O'Beirne, D. (2002): Effects of vegetable type and antimicrobial dipping on survival and growth of *Listeria innocua* and *E. coli*. *International journal of food science and technology*, 37: 711–718.

121. Fröder, H., Martins, C.G., de Souza, K.L.O., Landgraf, M.F.B., Destro, D.G.M., Teresa, M. (2007): “Minimally Processed Vegetable Salads: Microbial Quality Evaluation”, *Journal of food protection*, 70 (5): 1277-1280.
122. FSIS (2002). Food Safety and Inspection Service. (2002): United States Department of Agriculture. Recall Information Centre. [http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/rec\\_pr.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/rec_pr.htm)
123. Ghaouth, A.E., Arul, J., Ponnampalam, R., Boulet, M. (1991): Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of food science*, 56 (6): 1618-1620.
124. Ghayur, M.N., Gilani, A.H. (2007):  $\alpha$ -Adrenergic receptor mediated hypertensive and vasoconstrictor effects of dietary radish leaves extract. *Journal of health science*, 53 (2): 151-155.
125. Gil, M. I., Aguayo, E., Kader, A. A. (2006): Quality changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (12): 4284–4296.
126. Gill, A.O. (2000): Application of lysozyme and nisin to control bacterial growth on cured meat products. M.S. thesis, The University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada.
127. Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C., Montero, M.P. (2009): Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatine films by the addition of hydrolysates from squid gelatine. *Food hydrocolloids*, 23:1322-1327.
128. Giovannucci, E.L., Rimm, E.B., Liu, Y., Stampfer, M.J. & Willett, W.C. (2002): A prospective study of tomato products, lycopene and prostate cancer risk. *Journal of the national cancer institute*, 94 (5): 391-398.
129. Glass, K.A., Doyle, M.P. (1991): Fate of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in commercial, reduced-caloria mayonnaise. *Journal of food protection*, 54 (9): 691-695.
130. GMIA Gelatin Manufacturers Institute of America. Members as of January 2012.
131. Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders, B. D. (2010): *Listeria marthii* sp. nov., isolated from

- the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60: 1280-1288.
132. Gúcbilmez, C.M., Yemenicioğlu, A., Arslanoğlu, A. (2007): Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food research international*, 40: 80-91.
  133. Gunes, G., Watkins, C.B., Hotchkiss, J.H. (2001): Physiological responses of freshcut apples slices under high CO<sub>2</sub> and low O<sub>2</sub> partial pressures. *Postharvest biology and technology*, 22: 197-204.
  134. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2009): Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food microbiology*, 26: 142-150.
  135. Hadwiger, L.A., Kendra, D.F., Fristensky, B.W., Wagoner, W. (1986): Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi, in: *Chitin in nature and technology*, Muzzarelli, R., Jeuniaux, C., and Gooday, G.W. (Eds). Plenum Press, New York, pp. 209-214.
  136. Hall, H.K., Karem, K.L., Foster, J.W. (1995): Molecular response of microbes to environmental pH stress. *Advances in microbial physiology*, 37: 229-272.
  137. Han, J.H. (2000): Antimicrobial food packaging, *Food technology*, 54 (3), 56–65.
  138. Han, L., Kimura, Y., Okuda, H. (1999): Reduction in fat storage during chitin chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 23:174-9.
  139. Harris, L.J., Farber, J.N. et al. (2003): Incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, vol.2, chapter III.
  140. Hecht, S.S. (2000): Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug metabolism reviews*, 32 (3-4): 395-411.
  141. 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.

142. Hirano, S., Nago, N. (1989): Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens, *Agricultural and biological chemistry*, 53 (11): 3065-3066.
143. Hirano, S., Seino, H., Akiyama Y., Nonaka, I. (1990): Chitosan: A biocompatible material for oral and intravenous administrations. *Progress in biomedical polymers*, 283-290.
144. Hitchins, D. A. (1998): Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, *Bacteriological analytical manual*, chapter 10.
145. Hoet, S., Stévigny, C., Hérent, M.F., Quetin-Leclercq, J. (2006): Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta medica*, 72, 480–482.
146. Hoffman, K.L., Han, I.Y., Dawson, P.L. (2001): Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. *Journal of food protection*, 64: 885–889.
147. Hong, J.H., Gross, K.C. (2001): Maintaining quality of fresh-cut tomato slices through modified atmosphere packaging and low temperature storage. *Journal of food science*, 66 (7): 960-965.
148. Hongpattarakere, T., Riyaphan, O. (2008): Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosan prepared from carapace of black tiger shrimps. *Songklanakarin journal of science and technology*, 30:1-9.
149. Hossain, M. A., Kabir, M. J., Salehuddin, S. M., Das, A. K., Singha, S. K., Alam, M. K., Rahman, A. (2010): Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *Ocimum basilicum* occurring in Bangladesh. *Pharmaceutical biology*, 48 (5): 504-511.
150. Howard, L.R., Dewi, T. (1995): Sensory, microbiological and chemical quality of mini-peeled carrots as affected by edible coating treatment. *Journal of food science*, 60 (1): 142-144.
151. Hudson, J.A. (1992): Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology*, 14 (4): 178-180.

152. Hwang, J.K., Kim, H.J., Yoon, S.J., Pyun, Y.R. (1998): Bactericidal activity of chitosan on *E.coli*, in: Advances in chitin science, Chen, R.H. and Chen, H.C. (Eds.) Rita Adverztising Co.Ltd., Taiwan, pp. 340-344.
153. Hwang, C.A., Tamplin, M.L. (2005): The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad, International journal of food microbiology, 102 (3): 277-285.
154. Illum, L. (1998): Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharmaceutical research, 15 (9): 1326-31.
155. ISO 11290-1:1996 Amd.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 1: Detection method- Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test and inclusion of precision data.
156. ISO 11290-2:1998 Amd.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method-Amendment 1: Modification of the enumeration medium.
157. Ita, P.S., Hutkins, R.W. (1991): Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* ScottA in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. Journal of food protection, 54: 15–19.
158. Jacxsens, L., Devlieghere, F., Falcato, P., Debevere, J. (1999): Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas* spp. on fresh-cut produce packaged under equilibrium-modified atmosphere. Journal of food protection, 62: 1128-1135.
159. Jafarizadeh Malmiri, H., Osman, A., Tan, C.P., Abdul Rahman, R. (2011): Development of an edible coating based on chitosan-glycerol to delay ‘Berangan’ banana (*Musa sapientum* cv. Berangan) ripening process. International food research journal, 18 (3): 989-997.
160. Jagannath, J.H., Nanjappa, C., Das Gupta, D.K., Bawa, A.S. (2003): Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films. Journal of applied polymer science, 88 (1): 64-71.
161. James, M. Jay. (2000): Modern food microbiology, sixth edition, an aspen publication



162. Jang, S-A., Lim, G-O., Song, K.B. (2011 a): Effect of rapeseed protein–gelatin film containing grapefruit seed extract on ‘Maehyang’ strawberry quality. *International Journal of food science and technology*, 46: 620–625.
163. Je, J.Y., Kim, S.K. (2006): Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting outer and inner membrane. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 6629-6633.
164. Jeihanipour, A., Karimi, K., Taherzadeh, M.J. (2007): Antimicrobial properties of fungal chitosan. *Research journal of biological sciences*, 2 (3): 239-243.
165. Jensen, A., Thomsen, L.E., Jørgensen, R.L., Larsen, M.H., Roldgaard, B.B., Christensen, B.B., Vogel, B.F., Gram, L., Ingmer, H. (2008): Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *International journal of food microbiology*, 30: 254–261.
166. Jeon, Y.J., Park, P.J., Kim, S.K. (2001): Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate polymers*. 44, 71–76
167. Jeon, Y.J., Kim, S.K. (2002): Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *Journal of microbiology and biotechnology*, 12 (3): 503-7.
168. Jia, D., Fang, Y., Yao, K. (2009): Water vapour barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soyprotein isolate edible films. *Food and bioproducts processing*, 87: 7-10.
169. Jiang, Y., Joyce, D.C. (2002): 1-Methylcyclopropene treatment effects on intact and fresh-cut apple. *Journal of horticultural science and biotechnology*, 77 (1): 19-21.
170. Jin, A.S., Kyung, K.M. (2001): Effect of dry powders, ethanol extracts and juices of radish and onion on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Han’guk Yongyonghak Hoeji* 34: 513–524.
171. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Murgov, I., Schmidt, E., Geissler, M. (2005): Antimicrobial testings and gas chromatographic analysis of pure oxygenated monoterpenes 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, terpene-4-ol and camphor as well as target compounds in essential oils of pine (*Pinus pinaster*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and tee tree (*Melaleuca alternifolia*). *Scientia pharmaceutica*, 73: 27–39.

172. Jocić, D., Topalović, T. (2004): Biopolimer hitozan: Svojstva, interakcije i primena u obradi tekstilnog materijala. *Hemijska industrija*, 58 (10): 457-469.
173. Kalagasidis Krušić, M. (2007): Hidrogelovi i kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci, *Zadužbina Andrejević*, Beograd.
174. Kamyabi, N. (2011): Reconsideration of whey clarification using chitosan and decalciumphosphation using thermal treatment. *World applied sciences journal* 14 (Special Issue of Food and Environment): 101-105.
175. Kanatt, S.R., Rao, M.S., Chawla, S.P., Sharma, A. (2013): Effects of chitosan coating on shelflife of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT- Food science and technology*, 53: 321–326.
176. Kim, D.M., Smith, N.L., Lee, C.Y. (1993): Quality of minimally processed apple slices from selected cultivars. *Journal of food science*, 58 (5): 1115-1117, 1175.
177. Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. (1995): Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborn pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43 (11): 2839-2845.
178. Kim, H., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H., Jin, Z. (2004): Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 2849–2854.
179. Kim, S.K., Rajapakse, N. (2005): Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate polymers*, 62 (4): 357-68.
180. King Jr, A.D., Bolin, H.R. (1989): Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food technology*, 43: 132-135, 139.
181. Klaus, A., Beatović, D., Nikšić, M., Jelačić, S., Nedović, V., Petrović, T. (2008): Influence of ethereal oils extracted from *Lamiaceae* family plants on some pathogen microorganisms. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 115: 65-74.
182. Klaus, A., Beatović, D., Nikšić, M., Jelačić, S., Petrović, T. (2009): Antibacterial activity of aromatic plants essential oils from Serbia against the *Listeria monocytogenes*. *Journal of agricultural sciences*, 54 (2): 95-104.

183. Kljujev, I.S. (2012): Kontaminacija biljaka patogenim bakterijama iz vode za navodnjavanje. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Zemun.
184. Kokoszka, S., Debeaufort, F., Hambleton, A., Lenart, A., Voilley, A. (2010): Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative food science and emerging technologies*, 11: 503–510.
185. Kourwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, W. (2011): *Journal of food science*, 76: 90.
186. Kovačević, N. (2004): Osnovi farmakognozije, Srpska školska knjiga, Beograd.
187. Kowalczyk, D., Baraniak, B. (2011): Effects of plasticizer, pH and heating of filmforming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of food engineering*, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.037.
188. Kristo, E., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C.G. (2008): Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food hydrocolloids*, 22: 373–386
189. Krochta, J.M. (2001): FAQ about edible films and coatings <http://www.dairybiz.com/feature.htm> 5/7/02.
190. Krochta, J.M., De Mulder-Johnston, C. (1997): Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food technology*, 51 (2): 61–74.
191. Lake, R., Hudson, A., Cressey, P., Gilbert, S. (2005): Risk profile: *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads. Institute of Environmental Science & Research Limited Christchurch Science Centre, New Zealand.
192. Lang Halter, E., Neuhaus, K., Scherer, S. (2013): *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 641-647.
193. Larsson, S.C., Hakansson, N., Naslund, I., Bergkvist, L., Wolk, A. (2006): Fruit and vegetable consumption in relation to pancreatic cancer: a prospective study. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention*, 15: 301-305.
194. Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet- Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., Allerberger, F.

- (2010): *Listeria rocourtiae* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 60: 2210-2214.
195. Li, X.F., Feng, X.Q., Yang, S., Wang, T.P., Su, Z.X. (2008): Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*. Iranian polymer journal, 17 (11): 843-852.
196. Li, P., Barth, M.M. (1998): Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly processed carrots. Postharvest biology and technology, 14: 51-60.
197. Lim, L.-T., Mine, Y., Brit, I.J., Tung, M.A. (2002): Formation and properties of egg white films and coatings. In: Protein-based films and coatings. Ed. A. Gennadios, CRC Press, Florida, USA.
198. Lin, C.T.J., Jensen, K.L., Yen, S.T. (2005): Awareness of food borne pathogens among US consumers. Journal of food quality and preference, 16: 401- 412.
199. Lindsay, J.A., Gross, K.C., Thayer, D.W., Hicks, K.B. (1999): Minimizing microbes on fresh-cut foods. ARS News and Information.  
<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/jun99/food0699.htm>.
200. Liu, H., Du, Y., Wang, X., Sun, L. (2004): Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. International journal of food microbiology, 95: 147-155.
201. Liu, Ch.-Ch., Tellez-Garay, A.M., Castell-Perez, M.E. (2004 a): Physical and mechanical properties of peanut protein films. LWT -Food science and technology, 37: 731-738.
202. Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z., Yao, K.D. (2001): Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, Journal of applied polymer science, 79: 1324-1335.
203. Liu, N., Chen, X.G., Park, H.J., Liu, C.G., Liu, C.S., Meng, X.H., Yu, L.J. (2006): Effect of molecular weight and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. Carbohydrate polymers, 64: 60–65.
204. Liu, L.S., Liu, C.-K., Fishman, M.L., Hicks, K.B. (2007): Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. Journal of agricultural and food chemistry, 55: 2349–2355.

205. Liu, J., Zhang, J., Xia, W. (2008): Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 107 (1): 419-25.
206. Lopez, P., Sanchez, C., Battle, R., Nerian, C. (2007): Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55: 4348-4356.
207. Martin-Belloso, O., Soliva- Fortuny, R. (2011): Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing, *Food preservation technology*, 1-13.
208. McLauchlin, J. (1987): *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of applied bacteriology*, 63: 1-11.
209. McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K. (2004): *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International journal of food microbiology*, 92: 15–33.
210. McLaughlin, J., Rees, C.E.D. (2009): Genus I. *Listeria*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, E. A. Rainey *et al* (eds). 2nd edn. New York, USA, Springer, pp. 244-257.
211. Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S., Okamoto, Y. (2007): Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate polymers*, 67: 640-4.
212. Minami, S. (1997): Mechanism of wound healing acceleration by chitin and chitosan, *Japanese journal of veterinary research*, 44 (4): 218-219
213. Min, S., Harris, L.J., Krochta, J.M. (2005): *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase systems. *Journal of food science*, 70 (7), M317-324.
214. Misiaka, I.J., Lipok, J. Nowakowska, E.M., Wieczorek, P.P., Młynarz, P., Kafarski, P. (2004): Antifungal Activity of the Carrot Seed Oil and its Major Sesquiterpene Compounds, *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen <http://www.znaturforsch.com>
215. Mizrahi, A., Fulder, S., Sheinman, N. (1997): Potentiating Health and the Crisis of the Immune System. Plenum Press, New York, 1997.

216. Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane M. (2009): Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *Journal of food science*, 74 (7): M358-63 doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01272.x.
217. Mohy Eldin, M.S., Soliman, E.A., Hashem, A.I., Tamer, T.M. (2008): Antibacterial activity of chitosan chemically modified with new technique. *Trends in biomaterials and artificial organs*, 22 (3): 125-137.
218. Murillo, G., Mehta, R.G. (2001): Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 41 (1-2):17-28.
219. Murray E. G. D., Webb, R. A., Swann, M. B. R. (1926): A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus: *Bacterium monocytogenes*. *Journal of pathology and bacteriology*. 29, 407-439.
220. Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., Varaldo, P.R. (1990): Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 2019-2023.
221. Nevas, M., Korhonen, A., Lindstrom, M., Turkki, P., Korkeala, H. (2004): Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of food protection*, 67: 199–202.
222. Nešić, A. (2012): Karakterizacija i primena kompleksa na bazi hitozana i amidovanog pektina za uklanjanje azo boja iz vodenih rastvora. Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet Beograd.
223. Nguefack, J., Budde, B. B., Jakobsen, M. (2004): Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Letters in applied microbiology*, 39(5): 395-400.
224. Nguyen-The, C., Lund, B.M. (1991): The lethal effect of carrot on *Listeria* species. *Journal of applied bacteriology*, 70 (6): 479-88.
225. Nielsen, L.E., Landel R.F. (1994): *Mechanical properties of polymers and composites*, 2nd Ed. Marcel Dekker: New York.

226. No, H.K., Kim, S.H., Lee, S.H., Park, N.Y., Prinyawiwatkul, W. (2006): Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydrate polymers*, 65: 174-178.
227. 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.
228. No, H.K, Meyers, S.P. (2000): Application of chitosan for treatment of wastewaters. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 163: 1-28.
229. Noriega, E., Newman, J., Siggers, E., Robertson, J., Laca, A., Díaz, M., Brocklehurst, T.F. (2010): Antilisterial activity of carrots: Effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food research international*, 43 (10): 2425–2431.
230. Nutt, J.D., Li, X., Woodward, C.L., Zabala-Diaz, I.B., Ricke, S.C. (2003): Growth kinetics response of a *Salmonella typhimurium* poultry marker strain to fresh produce extracts. *Bioresource technology*, 89: 313-316.
231. O'Driscoll, B., Gaham, C., Hill, C. (1996): Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic food during milk fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 62 (9): 3128-3132.
232. Oguntibeju, O.O., Truter, E.J., Esterhuysen, A.J. (2013): The role of fruit and vegetable consumption in human health and disease prevention, chapter 7. InTech (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>)
233. Onishi, H., Machida, Y. (1999): Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20 (2): 175–182
234. 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.
235. Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A., Holley, R.A. (2000): Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of food science*, 65 (5): 768-773.

236. Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2004): Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 5598-5605.
237. Ozdermir, M. (1999): Antimicrobial releasing edible whey protein films and coatings. Ph.D. Dissertation, Purdue University, West Lafayette, IN.
238. Padgett, T., Han, L.J.Y., Dawson, P.L. (1998): Incorporation of food grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of food protection*, 61 (10): 1330-1335.
239. Pamplona-Roger, G.D. (1999): *Encyclopedia of Medicinal Plants*. Vol.1 and 2, (2ndEdn). Education and Health Library, The European Union, U.K.
240. Pangburn, S.H., Trescony, P.V., Heller, J. (1982): Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 3 (2): 105-8.
241. Pattarino, G., Arrigoni, S., Grazioli, R., De Palma, A., di Natale, B. (2006): A case of *Listeria monocytogenes* meningitis in an immunocompetent infant. *Minerva pediatrica*, 58: 391-4.
242. Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A. (2005): Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 113: 1–6.
243. Perdonés, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Vargas, M. (2012): Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest biology and technology*, 70: 32–41.
244. 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.
245. Phan-Than, L., Gorman, T. (1995): Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electroforesis. *Electroforesis*, 16: 444-450.
246. PHLS (1996): Public Health Service Laboratory Service, Communicable Disease Reports, Vol. 6, No. 37, 6 No. 50, 7 No. 15 and 7 No. 24.



247. Piazza, L., Dürr-Auster, N., Gigli, J., Windhab, E.J., Fischer, P. (2009): Interfacial rheology of soy proteins – High methoxyl pectin films. *Food hydrocolloids*, 23 (8): 2125-2131.
248. Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N. (2006): Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808–811.
249. Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., Sousa, I. (2010): Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food control*, 21: 240–246.
250. Podolak, R.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L., Fung, D.Y. (1995): Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 on beef by application of organic acids, *Journal of food protection*, 59 (4): 370-373.
251. Ponce, A.G., Roura, S.I., del Valle, C.E., Moreira, M.R. (2008): Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest biology and technology*, 49: 294–300.
252. Popović, G., Nikšić, M. (2007): Izolacija *Listeria monocytogenes* iz svežeg voća i povrća, *Ecologica*, 14: 139-144.
253. Popović S. (2013): Istraživanje dobijanja i karakterizacija biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad
254. Prajapati, B. (2008): Chitosan a marine medical polymer and its lipid lowering capacity. *The internet journal of health*, 9 (2).
255. Prattala, R., Irala-Estevez, J.D., Groth, M., Johansson, L., Oltersdorf, U., and Martinez-Gonzalez, M.A. (2007): A systematic review of socioeconomic differences in food habits in Europe: consumption of fruit and vegetables. *European journal of clinical nutrition*, 54: 706–14.
256. Priepke, P.E, Wei, L.S, Nelson, A.I. (1976): Refrigerated storage of prepackaged salad vegetables. *Journal of food science*, 41: 379-382.
257. Pusateri, A. E., McCarthy, S.J., Gregory, K.W., Harris, R. A., Cardenas, L., McManus, A. T., Goodwin, C.W. Jr. (2003): Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and

- hepatic injury in swine. *Journal of trauma-injury infection and critical care*, 54 (1): 177-182.
258. Raafat, D., von Bargaen, K., Haas, A., Sahl, H. G. (2008): Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and environmental microbiology*, 74: 3764-3773.
259. 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*, 11: 1457–1465.
260. Radford S.A., Board R.G. (1993): Review: Fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. *Food microbiology*, 10 (4): 269-278.
261. Ravi Kumar, M.N.V. (2000): A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers* 46: 1-27.
262. Ravishankar, S., Harisson, M.A. (1999): Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* strains does not offer cross-protection against an activated lactoperoxidase system. *Journal of food protection*. 62 (6): 670-3.
263. Rhim, J.W., Hong, S.I., Park, H.M. Ng, P.K.W. (2006): Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 5814-5822.
264. Rhoades, J., Roller, S. (2000): Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and environmental microbiology*, 66 (1): 80–84.
265. Ribar, Lj., Petrović, S., Hristov, S., Pavlović, G., Božović, V. (2000): Osetljivost nekih mikroorganizama na biološki aktivne supstance izolovane iz aromatičnog i lekovitog bilja. *Zbornik naučnih radova*, 6: 551 – 554.
266. Rocha, A.M.C.N., Brochado, C.M., Morais, A.M.M.B. (1998): Influence of chemical treatment on quality of cut apple (cv. Jonagored). *Journal of food quality*, 21 (1): 13-28.
267. Rodrigues, E.T., Han, J.H. (2000): “Antimicrobial whey protein films against spoilage and pathogenic bacteria” in *2000 IFT Annual Meeting Book of Abstracts*, Chicago, IL: Institute of Food Technologists, p. 191.

268. Rojas-Grau, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Friedman, M., Henika, R.P., Martin-Belloso, O., McHugh, T.H. (2006): Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (24): 9262-9267.
269. Rosas, I., Baez, A., Couitino, M. (1984): Bacteriological quality of crops irrigated with waste water in the Xochimilco Plots, *Applied and environmental microbiology*, 47: 1074-1079.
270. Rungsardthong, V., Wongvuttanakul, N., Kongpien, N., Chotiwaranon, P. (2006): Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. *Process biochemistry*, 41 (3): 589–593.
271. Rupasinghe, H.P.V., Yu, L.J. (2012): Emerging preservation methods for fruit juices and beverages. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
272. Rushing, J., Angulo, F.J., Beuchat, L. R. (1996): Implementation of a HACCP program in a commercial fresh-market tomato packinghouse: a model for the industry. *Dairy, food and environmental sanitation*, 16: 549–553.
273. Russell, N.J., Evans, R.I., Hellenmons, J., Verheul, A., Abee, T. (1995): Membranes as a target for stress adaptation. *International journal of food microbiology*, 28: 255-261.
274. Rwan, J. Wu, J. (1996): Deacidification of grapefruit juice with chitosan. *Food science*, 23: 509-519.
275. Sadhana Ravishankar, Harrison, M.A. (1999): Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* strains does not offer cross-protection against an activated lactoperoxidase system. *Journal of food protection*, 62 (6): 670 – 673.
276. Jabbar, Z., Angham, A., Sami, G.H.F. (2014) Removal of azo dye from aqueous solutions using chitosan. *Oriental journal of chemistry*, 30 (2): 571-575.
277. Saito, M., Rai, D. R., Masuda, R. (2000): Effect of modified atmosphere packaging on glutathione and ascorbic acid content of asparagus spears. *Journal of food processing and preservation*. 24: 243–251.
278. Salvador, L., Miranda, S. P., Aragon, N., Lara, V. (1999): Chitosan coating on avocado fruit. *The Revista de la Sociedad Quimica de Mexico*, 43 (1): 18–23.

279. Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., Cháfer, M. (2011): Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest biology and technology*, 60: 57–63.
280. Santana-Rios, G., Orner, G.A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.Y., Dashwood, R.H. (2001): Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. *Mutation research*, 495: 61–74.
281. Sant’Ana, A.S., Barbosa, M.S., Destro, M.T., Landgraf, M., Franco, B.D. (2012). Growth potential of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International journal of food microbiology*, 157: 52-58.
282. Schmidt, E., Jirovetz, L., Buchbauer, G. et al. (2005): Antimicrobial testing and gas chromatographic analysis of aroma chemicals. *Journal of essential oil bearing plants*, 8: 99–106.
283. Seaberg, A., Labbe, R., Shetty, K. (2003): Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Elite Clonal Extracts of Oregano (*Origanum vulgare*). *Food biotechnology*, 17 (2).
284. Seeliger, H.P.R., Jones, D. (1986): *Listeria* pp. 1235-1245 In P.H.A. Sneath N.S.Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
285. Seifried, H.E., McDonald, S.S., Anderson, D.E., Greenwald, P., Milner, J.A. (2003): The antioxidant conundrum in cancer. *Cancer research*, 63: 4295-4298.
286. Severino, R., Vu, K.D., Donsì, F., Salmieri, S., Ferrari, G., Lacroix, M. (2014): Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans. *International journal of food microbiology*, 191: 82-88.
287. Severino, R., Vu, K.D., Donsì, F., Salmieri, S., Ferrari, G., Lacroix, M. (2014 a): Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. *Journal of food engineering*, 124: 1-10.

288. Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999): Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science and technology*, 10: 37-51.
289. Shailendra, C.S., Ruch, A. (2013): Evaluation of antibacterial activity of volatile oil from *Mentha spicata* L. *Journal of drug delivery and therapeutics*, 3 (4): 120-121.
290. Sher, H., Al-Yemeni, M., Hazrat, S. (2010 a): Effect of environmental factors on the yield of selected mushroom species growing in two different agro ecological zones. *Saudi journal of biological sciences*, 17 (4): 321-326.
291. Shigemasa, Y., Minami, S. (1995): Application of chitin and chitosan for biomaterials, *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 13 (1): 383-420.
292. Shimizu, T. (2003): Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison, *Nutrition research reviews*, 16: 241–252.
293. Shimojoh, M., Masaki, K., Kurita, K., Fukushima, K. (1996): Bacterial effects of chitosan from squid pens on oral Streptococci, *Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan society for bioscience biotechnology and agrochemistry* 70 (7): 787-792.
294. Silk, B.J., Date, K.A., Jackson, K.A., Pouillot, R., Holt, K.G., Graves, L.M., Ong, K.L., Hurd, S., Meyer, R., Marcus R., Shiferaw B., Norton, D.M., Medus, C., Zansky, S.M., Cronquist, A.B. Henao, O.L., Jones, T.F., Vugia, D.J., Farley, M.M., Mahon, B.E. (2012): Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004–2009: Further Targeted Prevention Needed for Higher-Risk Groups. *Clinical infectious diseases*, 54 (S5): S396–404.
295. Silk, B.J., Mahon, B.E., Griffin, P.M., Gould, H., Tauxe, R.V., Crim, S.M., Jackson, K.A., Gerner-Smidt, P., Herman, K.M., Henao, O.L. (2013): Div of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, CDC.
296. Singh, P., Singh, J. (2013): Medicinal and therapeutic utilities of *Raphanus sativus*. *International journal of plant, animal and environmental sciences*, 3 (2): 103-105.
297. Skočibušić, M., Bezić, N., Dunkić, V., Radonić, A. (2004): Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oil against respiratory tract pathogens. *Fitoterapia*, 75: 733–736.

298. 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.
299. Sonti, S. (2000): Consumer perception and application of edible coatings on fresh-cut fruits and vegetables. Osmania University College of Technology.
300. Southon, S. (2000): Increased fruit and vegetable consumption within EU: potential health benefits. Food research international, 33: 211-217.
301. Spagna, G., Pifferi, P.G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G. and Palmonari, R. (1996): The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. Food research international, 29: 241-248.
302. Strack, D., Pieroth, M., Scharf, H., Sharma, V. (1985): Tissue distribution of phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus* L. Planta, 164: 507-511.
303. Sumiyoshi, M., Kimura, Y. (2006): Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. Journal of pharmacy and pharmacology, 58: 201-7.
304. Tan, Y.M, Lim, S.H., Tay, B.Y., Lee, M.W., Thian, E.S. (2015): Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology. Materials research bulletin, 69: 142-146
305. Tanigawa, T., Tanaka, Y., Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y. (1992): Various biological effects of chitin derivatives, in: Advances in chitin and chitosan, Brine, C.J., Sandford, P.A., Zikakis, J.P., (Eds.) Elsevier Science Publishers Ltd., London, New York, pp. 206-215.
306. Tassou, C.C., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E. (1995): Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. Journal of applied microbiology, 78 (6): 593–600.
307. Thakhiew, W., Devahastin, S., Soponronnarit, S. (2013): Physical and mechanical properties of chitosan films as affected by drying methods and addition of antimicrobial agent. Journal of food engineering, 119: 140–149.

308. Thakhiew, W., Champahom, M., Devahastin, S., Soponronnarit, S. (2015): Improvement of mechanical properties of chitosan-based films via physical treatment of film-forming solution. *Journal of food engineering*, 158: 66-72.
309. Tohill, B.C., Seymour, J., Serdula, M., Kettel-Khan, L., Rolls, B.J. (2004): What epidemiological studies tell us about the relationship between fruit and vegetable consumption and body weight. *Nutrition reviews*, 62: 365-374.
310. Tokura, S., Ueno, K., Miyazaki, S., Nishi, N. (1997): Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromolecular symposia*, 120: 1-9.
311. Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V. (2005): Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food chemistry*, 89: 549– 554.
312. Tsai, G.J., Su, W.H. (1999): Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, 62 (3): 239-243.
313. Tsai, G. J., Su, W. H., Chen, H. C., Pan, C. L. (2002): *Fisheries Sci.*, 68: 170-177
314. Tsai, G. J., Zhang, S. L., Shieh, P. L. (2004): *Journal of food protection*, 67: 396-398.
315. Tsukada, K., Matsumoto, T., Aizawa, K., *et al.* (1990): Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Japanese journal of cancer research*, 81 (3): 259-65.
316. Ueno, H., Mori, T., Fujinaga, T. (2001): Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 52: 105-15.
317. USDA - United States Department of Agriculture (2000): Nutrition and your health: dietary guidelines for Americans. Home and Garden Bull. 232, USDA, Washington DC ([www.usda.gov/cnpp](http://www.usda.gov/cnpp)).
318. Uzeh, R.E., Adepoju, A. (2013). Incidence and survival of *E. coli* and *L. monocytogenes* on salad vegetables, *International food research journal*, 20: 1921-1925.
319. Van Duyn, M.A., Pivonka, E. (2000): Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional. *Journal of the American dietetic association*, 99 (10): 1241-1248.

320. Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C. (2006): Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings. *Postharvest biology and technology*, 41: 164–171.
321. Vasilatos, G.C., Savvaidis, I.N. (2013): Chitosan or rosemary oil treatments, singly or combined to increase turkey meat shelf-life. *International journal of food microbiology*, 166: 54-58.
322. Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., *i sar*. (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14: 584-640.
323. Vu, K.D., Hollingsworth, R.G., Leroux, E., Salmieri, S., Lacroix, M. (2011): Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food research international*, 44: 198–203.
324. Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Huang, J., Kerry, J.F., Kerry, J.P. (2008): Effect of pH and addition of corn oil on the properties of whey protein isolate-based films using response surface methodology. *International journal of food science and technology*, 43: 787–796.
325. Wang, L., Auty, M.A.E., Rau, A., Kerry, J.F., Kerry, J.P. (2009): Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. *Journal of food engineering*, 90: 11–19.
326. Wang, X., Du, Y., Liu, H. (2004): Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. *Carbohydrate polymers*, 56 (1): 21–26.
327. Wanyao Xia, Wei Liu, Lei Cui, Yuanchun Liu, Wei Zhong, Deli Liu, Juanjuan Wu, Kienhui Chua, Yilin Cao. (2004): Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part B: Applied Biomaterials*; 71B (2): 373–380.
328. Wardy, W., Martinez, K.D.P., Xu, Z., No, H.K., Prinyawiwatkul, W. (2014): Viscosity changes of chitosan solution affect physico-functional properties and consumer perception of coated eggs during storage. *LWT - Food science and technology*, 55: 67-73.
329. Wargovich, M.J. (2000): Anticancer properties of fruits and vegetables. *Horticultural science* 35: 573-575.



330. Watada, A.E., Ko, N.P., Minott, D.A. (1996): Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest biology and technology*, 9:115-125.
331. Watada, A.E., Qi, L. (1999): Quality of fresh-cut produce. *Postharvest biology and technology*, 15 (3): 201-205.
332. Watal, G., Shukla, S., Chatterji, S., Yadav, D.K. (2011): Antimicrobial efficacy of *Raphanus sativus* root juice. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3 (5): 89-92.
333. Weng, W.Y., Osako, K., Tanaka, M. (2009): Oxygen permeability and antioxidative properties of edible surimi films, *Fisheries science*, 75: 233–240.
334. Yalpani, M., Johnson, F., Robinson, L.E. (1992): Antimicrobial activity of some chitosan derivatives, in: *Advances in chitin and chitosan*, Brine, C.J., Sandford, P.A., Zikakis, J.P., (Eds.) Elsevier Science Publishers Ltd., London, New York, pp. 543-548.
335. Yang, G., Gao, Y.T., Shu, X.O., Cai, Q., Li, G.L., Li, H.L., Ji, B.T., Rothman, N., Dyba, M., Xiang, Y.B., Chung, F.L., Chow, W.H., Zheng, W. (2010): Isothiocyanate exposure, glutathione S-transferase polymorphisms, and colorectal cancer risk. *American journal of clinical nutrition*, 91 (3): 704-11.
336. Yoo, S.R., 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*, DOI 10.1002/jsfa.4502
337. Young, K. M., Foegeding, P. M. (1993): Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect of intracellular pH. *Journal of applied bacteriology*, 74: 515-520.
338. Zhang, D., Quantick, P.C. (1997). Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Postharvest biology and technology*; 12 (2): 195-202.
339. Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y.L., Sun, X. (2009): Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat science*, 81: 686-692.

340. Zhang, Z.H, Han, Z., Zeng, X.A., Xiong, X.Y., Liu, Y.J. (2015): Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin. *International Journal of biological macromolecules*, 81: 638-643.
341. Zhang W., Chen, J., Chen, Y., Xia, W., Xiong, Y. L., Wang, H. (2016): Enhanced physicochemical properties of chitosan/whey protein isolate composite film by sodium laurate-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 138: 59-65.
342. Zhao, R., Totley, P., Halley, P.J. (2008): Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based nio-nanocomposites. *Journal of material science*, 43: 3058-3071.

## Biografija autora

Mr Gordana D. Jovanović je rođena 26. 05. 1975. godine u Beogradu, Republika Srbija.

Srednju hemijsku školu "17. Oktobar" završila je u Grockoj 1993. godine. Na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, diplomirala je 2001. godine. Iste godine upisala je poslediplomske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Prehrambena tehnologija, uža oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija. Magistarsku tezu pod naslovom: "Uticaj etarskih ulja na rast *Listeria monocytogenes* u povrću" odbranila je 2007. godine na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Zaposlena je u Visokoj tehnološkoj školi strukovnih studija u Šapcu. Za predavača za užu naučnu oblast Prehrambena tehnologija, izabrana je 2007. godine.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisana: Gordana D. Jovanović

Broj indeksa ili prijava doktorske disertacije \_\_\_\_\_

**Izjavljujem**

Da je doktorska disertacija pod naslovom:

Ispitivanje antimikrobnih osobina hitozana na rast *Listeria monocytogenes* u povrću

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**U Beogradu, 10.03.2016.**

**Potpis doktoranda**

G. Jovanović

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske  
verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora: Gordana D. Jovanović

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije : \_\_\_\_\_

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov doktorske disertacije: Ispitivanje antimikrobnih osobina hitozana na rast *Listeria monocytogenes* u povrću

Mentor : dr Anita Klaus, docent, Poljoprivredni fakultet

Potpisana: Gordana D. Jovanović

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 10.03.2016.

**Potpis doktoranda**

*G. Jovanović*

**Prilog 3.**

**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje antimikrobnih osobina hitozana na rast *Listeria monocytogenes* u povrću

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa ovim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima.

U Beogradu, 10.03.2016.

**Potpis doktoranda**

*Jovanović*