

TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET UNIVERZITET U BEOGRADU

35/297
(Broj zahteva)
04.11.2013.
(datum)

VEĆE NAUČNIH OBLASTI TEHNIČKIH NAUKA
(naziv veća naučne oblasti kome se zahtev upućuje)

Beograd, Studentski trg br. 1

ZAHTEV
za davanje saglasnosti na referat o urađenoj doktorskoj disertaciji

Molimo da, shodno članu 46. st. 5. Statuta Univerziteta u Beogradu ("Glasnik Univerziteta" broj 131/06), date saglasnost na referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata

Mr TIJANE (Zoran) ĐORĐEVIĆ
(ime, ime jednog od roditelja i prezime)

KANDIDAT: **Mr TIJANA (Zoran) ĐORĐEVIĆ**, prijavila je doktorsku disertaciju pod nazivom:
(ime, ime jednog od roditelja i prezime)

„Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita”

Iz naučne oblasti: **HEMIJA I HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

Univerzitet je dana **04.03.2013. godine**, svojim aktom **02 broj 61206-686/2-13**, dao saglasnost na predlog teme doktorske disertacije koja je glasila:

„Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita”

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata:

Mr TIJANE (Zoran) ĐORĐEVIĆ
(ime, ime jednog od roditelja i prezime)

obrazovana je na sednici održanoj **30.05.2013.** odlukom fakulteta pod br. **35/182.** u sastavu:

Ime i prezime člana komisije	Zvanje	Naučna oblast
1. Dr Slavica Šiler-Marinković	Redovni profesor	Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija
2. Dr Rada Đurović-Pejčev	Naučni saradnik	Poljoprivreda-zaštita bilja
3. Dr Suzana Dimitrijević	Vanredni profesor	Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Nastavno-naučno veće Fakulteta prihvatilo je izveštaj Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije na sednici održanoj dana **26.09.2013. godine**.

DEKAN FAKULTETA

Prof. dr Đorđe Janačković

Prilog:

1. Doktorska disertacija
2. Izveštaj Komisije sa predlogom
3. Akt Nastavno-naučnog veća Fakulteta o usvajanju izveštaja

Na osnovu čl. 128. Zakona o visokom obrazovanju, čl. 129. Statuta TMF-a, na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta od 26.09.2013. godine doneta je

O D L U K A

o prihvatanju Referata o urađenoj doktorskoj disertaciji

Prihvata se Referat Komisije u sastavu: dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, dr Rada Đurović-Pejčev, naučni saradnik Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun, dr Suzana Dimitrijević, vanredni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta o pregledu i oceni urađene doktorske disertacije pod nazivom: „**UTICAJ FERMENTACIJE NA DEGRADACIJU OSTATAKA PESTICIDA U FERMENTISANIM PROIZVODIMA OD ŽITA**“ koju je podnela **mr TIJANA ĐORĐEVIĆ** i upućuje se na saglasnost Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu.

Veće naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu dalo je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije **mr Tijane Đorđević**, pod nazivom „**UTICAJ FERMENTACIJE NA DEGRADACIJU OSTATAKA PESTICIDA U FERMENTISANIM PROIZVODIMA OD ŽITA**“ Odlukom 02 broj: 61206-686/2-13 od 04.03.2013. godine.

RADOVI OBJAVLJENI U NAUČNIM ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA –M20

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu – M22

T. Đorđević, S. Šiler-Marinković, R. Đurović, S. Dimitrijević-Branković, J. Gajić-Umiljendić “Stability of the pyrethroid pesticide bifenthrin in milled wheat during thermal processing, yeast and lactic acid fermentation, and storage” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, in press (2013). Accepted article published: 19 April 2013. doi:10.1002/jsfa.6188 (Food Science & Technology 47/124, IF (2012) = 1.759) Paper ISSN: 0022-5142; Electronic ISSN: 1097-0010

Rad u međunarodnom časopisu – M23

T.Đorđević, S. Šiler-Marinković, R. Đurović, S. Dimitrijević-Branković, J. Gajić-Umiljendić “Dissipation of pirimiphos-methyl during wheat fermentation by *Lactobacillus plantarum*” *Letters in Applied Microbiology*, in press (2013). 2013/0848: accepted 28 June 2013. doi:10.1111/lam.12128 (Biotechnology & Applied Microbiology 102/159, IF (2012) =1.629) ISSN: 0266-8254

Odluku dostaviti: Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta, mentoru, Službi za nastavno-studentske poslove, Biblioteci i Arhivi fakulteta.

D E K A N

Prof. dr Đorđe Janačković

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Mr Tijane Đorđević, dipl. biol.

Odlukom br. 35/182 od 07.06.2013. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Mr Tijane Đorđević, pod naslovom:

„Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita“

Posle pregleda dostavljene disertacije, Komisija podnosi Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

**R E F E R A T
o urađenoj doktorskoj disertaciji**

1. UVOD

1.1. Naslov i obim disertacije

Doktorska disertacija pod naslovom „Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita“ Mr Tijane Đorđević, dipl. biologa, napisana je na 183 strane standardnog A4 formata, sadrži 8 slika, 53 tabele, 64 grafikona i podeljena je u 6 poglavlja. Na početnim stranama disertacije dat je Uvod, Teorijski deo, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključak i na kraju Literatura. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde za doktorsku disertaciju.

1.2. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- 18.10.2012. - Kandidatkinja Mr Tijana Đorđević, prijavila je temu za doktorsku disertaciju pod naslovom: „Ispitivanje uticaja fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita“.
- 29.11.2012. - Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu donelo je odluku o imenovanju Komisije za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije (broj odluke 35/407 od 03.12.2012. godine),
- 31.01.2013. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta usvojen je izveštaj Komisije za ocenu naučne zasnovanosti predložene teme doktorske disertacije pod nazivom: „Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita“ (broj odluke 35/23 od 01.02.2013.godine), a za mentore ove doktorske disertacije imenovane su dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor TMF i Dr Rada Đurović naučni saradnik Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine.
- 11.03.2013. Veće naučnih oblasti tehničkih nauka je dalo saglasnost za predlog teme navedene doktorske disertacije kandidatkinje Mr Tijane Đorđević, pod nazivom „Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita“.
- 30.05.2013. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Mr Tijane Đorđević, „Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita“ (broj odluke 35/182 od 07.06.2013. godine).

1.3. Mesto disertacije u odgovarajućoj naučnoj oblasti

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Hemija i hemijska tehnologija za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu.

Mentori dr Slavica Šiler –Marinković , redovni profesor TMF, i Dr Rada Đurović-Pejčev , na osnovu objavljenih radova i iskustva su kompetentne da rukovode izradom ove disertacije.

1.4. Biografski podaci o kandidatu

Tijana Đorđević je rođena 16. jula 1980. godine u Somboru, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Somboru. Studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, departman za biologiju i ekologiju, smer profesor biologije, upisala je školske 1999/2000. godine. Fakultetsku diplomu stekla je 04. oktobra 2004. godine odbranom diplomskog rada pod naslovom "Selekcija mikroorganizama za dobijanje proizvodnih sojeva".

Magistarske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, upisala je školske 2004/05. godine. Magistarsku tezu pod nazivom "Ispitivanje antioksidativne aktivnosti fermentisanih biljnih proizvoda" odbranila je 18. jula 2008. godine.

Na početku magistarskih studija bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, a od januara 2005. pa do završetka magistrature stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije. Od 01. februara 2005. do 31. jula 2008. godine kao stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije bila je angažovana na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a tokom tog trogodišnjeg istraživačkog rada učestvovala je na dva projekta Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije: TR 6713 – „Razvoj biomedicinskog tekstilnog materijala i proizvoda programiranih svojstava“ (2005-2007) и BTN-3710086 – „Program novih tehnologija u prehrambenoj industriji „Dodaci hrani dobijeni biotehnoškim putem“ (2005-2007).

Od 01. januara 2009. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za hemiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 24. aprila 2009. godine. Tokom dosadašnjeg istraživačkog rada na Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, učestvovala je na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije TR20036 „Razvoj i unapređenje bioracionalnih metoda zaštite bilja od bolesti i štetočina“ (2008.-2011.), a u novom projektnom ciklusu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije angažovana je na projektu TR 31043 – „Proučavanje biljnih patogena, artropoda, korova i pesticida u cilju razvoja metoda bioracionalne zaštite bilja i proizvodnje bezbedne hrane“ (2011.-2014.).

Oblast naučno-istraživačkog rada Tijane Đorđević obuhvata proučavanje antioksidativnih karakteristika konzumnih biljaka i lizata mikroorganizama. Pored toga, radila je i na razvoju i primeni analitičkih metoda za određivanje ostataka pesticida i teških metala u zemljištu i poljoprivrednim proizvodima. Takođe, bavila se proučavanjem uticaja pesticida na metabolizam, rast i razvoj mikroroganzama *L. plantarum* i *S. cerevisiae*, kao i na proces fermentacije pšenice tim mikroorganizmima. Ispitivala je i uticaj fermentacije pšenice ispitivanim mikroorganizmima na degradaciju rezidua pesticida hlорpirifos-metil, pirimifos-metil i bifentrin u zrnu.

U toku dosadašnjeg rada, bila je koautor jednog poglavlja u tematskom zborniku međunarodnog značaja, šesnaest radova u naučnim časopisima, od čega devet radova u časopisima međunarodnog značaja i sedam radova u časopisima nacionalnog značaja, kao i 14 naučnih saopštenja u zbornicima međunarodnih i nacionalnih skupova.

Iz oblasti teme doktorske disertacije do sada su objavljeni jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jedan rad u časopisu međunarodnog značaja (M23) i jedan rad u časopisu međunarodnog značaja verifikovanog posebnom odlukom (M24).

Čita, piše i govori engleski jezik.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Struktura i sadržaj disertacije

Doktorska disertacija kandidata Mr Tijane Đorđević, dipl. biologa, napisana je na 183 strane, u okviru kojih se nalazi 8 slika, 53 tabele, 64 grafikona i 216 literaturna navoda, i organizovana je u šest celina: Uvod, Teorijski deo, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura. Na početku disertacije dat je kratak Izvod na srpskom i engleskom jeziku, a Biografija kandidata je data na kraju.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U okviru Uvoda i Teorijskog dela ukazano je na mogućnost korišćenja prerade hrane kao mehanizma za redukciju pesticida sa akcentom na fermentaciju kao jedan od najstarijih, a danas veoma zastupljenih vidova prerade hrane.

Teorijski deo se sastoji iz sedam poglavlja: Pšenica kao osnovna namirnica u ljudskoj ishrani; Poljoprivreda kao jedan od mogućih izvora zagađenja pšeničnih prehrambenih proizvoda; Ulazak pesticida u lanac ishrane; Prerada hrane kao mehanizam za redukciju ostataka pesticida; Fermentativni mikroorganizmi; Analitičke metode pripreme uzoraka za određivanje ostataka pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina u fermentisanom žitnom supstratu i Eksperimentalni dizajn, a Cilj istraživanja je dat u Uvodu.

U poglavlju pod nazivom, Pšenica kao osnovna namirnica u ljudskoj ishrani, dat je kratak opis osnovnih karakteristika pšenice spelta (*Triticum spelta*) kao jedne od najznačajnijih ratarskih useva u svetu. U poglavlju pod nazivom Poljoprivreda, kao jedan od mogućih izvora zagađenja pšeničnih prehrambenih proizvoda razmatrana je kontaminacija pesticidima. Dat je kratak osvrt na istoriju korišćenja pesticida, opisane su njihove fizičke, hemijske i toksikološke osobine i data je osnovna podela pesticida. Detaljnije su opisani insekticidi, klasifikovani na organohlorne i organofosfatne insekticide, karbamate, piretroide i neonicotinoide. Za tri insekticida iz grupe organofosfata i piretroida (pirimifos-metil, hlörpirifos-metil i bifentrin) date su strukture, fizičko-hemijska svojstva, potencijalne primene, opisani njihovi produkti metabolizma, istaknuta toksičnost kao i maksimalno dozvoljene količine ovih agrohemijskih sredstava u pšenici. U poglavlju pod nazivom Ulazak pesticida u lanac ishrane, opisani su mogući putevi zagađenja namirnica pesticidima i ukazano je na ozbiljnost problema ove kontaminacije u svetu. Istaknuto je da je upravo porast kontaminacije prehrambenih proizvoda pesticidima, sa ozbiljnim posledicama na ljudsko zdravlje, dovela do potrebe za ispitivanjem mogućnosti korišćenja tehnika procesuiranja hrane u cilju smanjenja količine ostataka pesticida. U okviru poglavlja Prerada hrane, opisan je uticaj različitih tehnika koje se koriste tokom prerade i skladištenja namirnica na sadržaj pesticida u njima i to : razgradnja pod dejstvom toplote, rastvaranje, hidroliza, oksidacija, fotodegradacija, promena koncentracije ostatka pesticida zbog moguće promene mase namirnice, razdvajanje ostataka pesticida između faza, isparavanje i enzimski transformacija. Dat je relevantni literaturni pregled postojećih istraživanja o promenama u količini ostataka pesticida u finalnim proizvodima u toku procesa prerade namirnica. U ovom poglavlju su takođe prezentovana istraživanja iz oblasti uticaja procesa fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u različitim prehrambenim proizvodima. Ukazano je da istraživanja uticaja

fermentacije u toku tehnološke prerade plodova žitarica, na smanjenje ostataka pesticida do danas nisu u dovoljnoj meri zastupljena, i time je istaknut cilj ove disertacije. U sledećem poglavlju Fermentativni mikroorganizmi, date su karakteristike bakterija mlečno kiselinskog vrenja (BMK) sa akcentom na rod *Lactobacillus*, a posebno na vrstu *Lactobacillus plantarum*, i njihovu primenu u fermentaciji prehrambenih proizvoda. U ovom poglavlju su takođe opisane karakteristike i primena kvasaca, kao i sa tehnološkog aspekta najznačajnijeg roda *Saccharomyces* i vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Dodatno, opisan je biotehnološki proces proizvodnje kiselog testa, u kome suštinsku ulogu imaju upravo kvasci i bakterije mlečnokiselinskog vrenja.

U poglavlju pod nazivom Analitičke metode pripreme uzoraka za određivanje ostataka pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina u fermentisanom žitnom supstratu, razmatrane su poteškoće u vezi sa razvijanjem višerezidualnog metoda za određivanje što većeg broja aktivnih materija pesticida (koje pripadaju različitim klasama po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama) iz različitih matriksa. Kako je najkritičniji stupanj separacione hemijske analize priprema uzorka, koja se obično sastoji od tri podstupnja: ekstrakcija, koncentrisanje i prečišćavanje dobijenog ekstrakta, do danas je razvijen i validovan veliki broj analitičkih metoda za određivanje ostataka pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina u pšenici koje se zasnivaju upravo na različitim ekstrakcionim procedurama i prečišćavanjima. U ovom poglavlju dat je relevantni literaturni pregled postojećih analitičkih metoda i istaknuto, da uprkos njihovoj validnosti u određivanju ostataka ispitivanih pesticida u pšenici, njihova efikasnost u određivanju tih istih pesticida u fermentisanim pšeničnim proizvodima nije potvrđena, zbog čega je odabir adekvatne metode postavljen kao jedan od zadataka u istraživanju. U okviru poslednjeg poglavlja u Teorijskom delu, pod nazivom Eksperimentalni dizajn, opisan je postupak odzivne površine (RSM-response surface methodology) koji spada u najčešće korišćene postupke statistički planiranih eksperimenata, odnosno Box-Behnken dizajn (BBD) koji je korišćen prilikom postavljanja eksperimenata. Ovaj statistički dizajn odabran je s obzirom da se pokazao kao koristan metod za ispitivanje uticaja različitih faktora na analitički signal, a u ovom istraživanju ispitivan je uticaj tri različita fermentaciona faktora (na tri nivoa) na degradaciju pesticida u pšeničnom supstratu. Pomoću box-Behnken-ovog dizajna dobijeni su optimalni eksperimentalni uslovi pri kojima je efekat faktora na analitički odgovor najveći uz pojednostavljenje postavke eksperimenta.

U delu Materijal i metode, opisane su direktna i indirektna metoda, korišćene za utvrđivanja faza krive rasta, generacijskih vremena i koeficijenta rasta *Lactobacillus plantarum* i *Saccharomyces cerevisiae* u datim laboratorijskim uslovima. Predstavljen je eksperimentalni Box-Behnken dizajn sa tri faktora (veličina inokuluma, vreme fermentacije i temperatura) na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački, koji je korišćen za postupak optimizacije uslova mlečno-kiselinske i kvasne fermentacije pšenice. Opisane su i metode korišćene za utvrđivanje efikasnosti fermentacija (promene pH vrednosti, promene titrabilne kiselosti nakon fermentacije sa *L. plantarum*, produkcija CO₂ nakon fermentacije sa *S. cerevisiae* i metoda određivanja broja mikroorganizama u supstratu). Objašnjen je postupak definisanja uticaja pirimifos-metila, hlörpirifos-metila i bifentrina na rast i aktivnost korišćenih fermentativnih mikroorganizama. Zatim je opisan način testiranja efikasnosti fermentacije pšeničnog supstrata kome su dodati pesticidi, pri čemu su korišćene ranije opisane metode za utvrđivanje efikasnosti fermentacije pšenice. Dalje su opisane tri metode pripreme fermentisanih uzoraka za određivanje ostataka pesticida. Sve tri metode bazirane su na tečno-čvrstoj ekstrakciji i koncentrovanju pomoću rotacionog vakuum uparivača, dok su se metode prečišćavanja uzoraka razlikovale u sorbentima i rastvaračima korišćenim za eluiranje sa kolona za prečišćavanje. Definisani su uslovi rada na gasno-masenom spektrometru (GC/MS) koji je korišćen za detekciju i kvantifikaciju ispitivanih aktivnih materija. Konačno, opisan je postupak ispitivanja uticaja različitih fermentacionih parametara na stepen degradacije

pirimifos-metila, hlorthirifos-metila i bifentrina pri mlečnokiselinskoj i kvasnoj fermentaciji pšenice u laboratorijskim uslovima, pri čemu je za postavku eksperimenta korišćen pomenuti Box-Behnken dizajn. Dodatno, predstavljen je i način utvrđivanja doprinosa samog procesa fermentacije degradaciji pesticida, odnosno određivanja stepena degradacije izazvane samo aktivnošću fermentativnih mikroorganizama.

U delu Rezultati i diskusija, eksperimentalno dobijeni rezultati detaljno su analizirani i diskutovani u okviru šest poglavlja. Na osnovu rezultata dobijenih praćenjem dinamike rasta ćelija *L. plantarum* i *S. cerevisiae* utvrđeno je da se eksponencijalna faza rasta *L. plantarum* u MRS bujonu u datim laboratorijskim uslovima završava nakon 24 h na 30 °C, dok se eksponencijalna faza rasta *S. cerevisiae* u YPD bujonu završava nakon 5 h na 30 °C, tako da ova vremena predstavljaju optimalno trajanje svake sledeće aktivacije mikroorganizama. Optimizacija uslova mikrobioloških fermentacija žitnog supstrata u laboratorijskim uslovima u kojima se izvodi eksperiment u cilju utvrđivanja mogućnosti izvođenja efikasnih kontrolisanih fermentacija pokazala je da se maksimalna efikasnost fermentacije sa *L. plantarum* dostiže nakon 72 h pri 30 °C i uz inokulaciju od 6% (v/w), a maksimalna efikasnost fermentacije sa *S. cerevisiae* nakon 24 h pri 37 °C i uz inokulaciju od 8% (v/w). Što se tiče analitike pesticida, od tri testirane analitičke metode za pripremu uzoraka za određivanje ostataka ispitivanih pesticida u fermentisanim supstratima, metoda koja obuhvata kombinaciju 30 minutne ekstrakcije sa 25 mL smeše metanol:aceton=1:1 i prečišćavanja na florisilskoj koloni eluiranjem sa 25 mL smeše etil-acetat:aceton=4:1, pokazala se kao najadekvatnija i odabrana je za praćenje degradacije ispitivanih pesticida u toku fermentacije. Dobijeni prinosi ove metode su 93,0-96,0 % za pirimifos-metil, 82,8-88,2 % za hlorthirifos-metil i 80,5-82,6 % za bifentrin sa relativnim standardnim devijacijama od 2,2-3,5 %; 2,5-4,6 % i 2,2-4,1 %, za ova tri pesticida.

Ispitivanjem uticaja pirimifos-metila, hlorthirifos-metila i bifentrina na rast i aktivnost korišćenih fermentativnih mikroorganizama utvrđeno je da su i *L. plantarum* i *S. cerevisiae* relativno neosetljivi na prisustvo bifentrina u podlozi, dok prisustvo organofosfata u velikoj meri negativno utiče na njihov rast, pri čemu značajnije na kvasac. Pirimifos-metil najnegativnije utiče na rast obe vrste mikroorganizama.

Rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja prisustva korišćenih pesticida u pšenici na efikasnost fermentacija žitnog supstrata, ukazuju da se prisustvo pirimifos-metila i hlorthirifos-metila, iako negativno utiče na porast brojnosti *L. plantarum*, ne odražava negativno na mlečnokiselinsku fermentaciju pšenice, izraženu kroz snižavanje pH vrednosti i produkciju mlečne kiseline, dok prisustvo bifentrina u manjoj meri utiče na oba pokazatelja efikasnosti fermentacije. Sa druge strane, prisustvo sva tri ispitivana pesticida negativno utiče kako na porast brojnosti *S. cerevisiae* u pšeničnom supstratu, tako i na ukupnu kvasnu fermentaciju pšenice izraženu kroz snižavanje pH vrednosti i produkciju CO₂.

Ispitivanje uticaja različitih fermentacionih parametara na stepen degradacije pirimifos-metila, hlorthirifos-metila i bifentrina pri mlečnokiselinskoj fermentaciji pšenice u laboratorijskim uslovima, pokazalo je da je ukupna degradacija u toku fermentativnog procesa najveća za hlorthirifos-metil (88-93 %), nešto manje smanjenje zabeleženo je kod pirimifos-metila (71-82%), a najmanje kod bifentrina (35-65%). Fermentacija pšenice sa *Saccharomyces cerevisiae* takođe dovodi do smanjenja rezidua sva tri ispitivana pesticida, najviše kod hlorthirifos-metila (93-98 %), nešto manja redukcija zabeležena je kod pirimifos-metila (63-77 %), a najmanja kod bifentrina (36-49 %).

Smanjenje sadržaja pesticida je rezultat delovanja fizičko-hemijskih parametara tokom pripreme supstrata za fermentaciju i biotehnološkog delovanja samih mikroorganizama tokom fermentacije. Ako se posmatra samo aktivnost mikroorganizama, onda *L. plantarum* u najvećoj meri dovodi do degradacije bifentrina (15-44 %), nešto manje pirimifos-metila (10-

27 %), a najmanje hlorspirifos-metila (9-14 %). Slično je i za *S. cerevisiae* čija aktivnost u najvećoj meri dovodi do degradacije bifentrina (16-28 %), nešto manje pirimifos-metila (3-30 %), a najmanje hlorspirifos-metila (14-20 %). Uopšteno gledano, Degradacija pirimifos-metila i bifentrina veća je u toku mlečnokiselinske fermentacije, dok je degradacija hlorspirifos-metila veća u toku kvasne fermentacije pšenice.

Na kraju analize Rezultata i diskusije izvedni su Zaključci u kojima su sažeto izneti postignuti rezultati u istraživanju, a koji odgovaraju postavljenim ciljevima disertacije. Na kraju rada dat je spisak korišćene literature, kao i biografija kandidatkinje, izjave o autorstvu i istovetnosti štampane i elektronske verzije rada.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost, originalnost i značaj

U literaturi postoji značajan broj radova, koji se odnose na ispitivanje uticaja tehnika procesuiranja hrane u toku prerade biljnog materijala na smanjenje nivoa pesticida u njima. U poslednjih petnaest godina je poraslo interesovanje za mogućnost korišćenja fermentacionih procesa, kao danas veoma zastupljenih vidova prerade hrane, u cilju smanjenja količine ostataka pesticida, odnosno interesovanje za delovanje fermentativnih mikroorganizama na degradaciju ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima.

Iz literature je poznato da postoji pozitivan uticaj fermentacije na smanjenje nivoa ostataka brojnih pesticida. Prednost ovakvog načina redukcije ostataka pesticida u finalnom proizvodu ogleda se ne samo u tome, što se time ostavlja mogućnost nesmetane primene pesticida, zahvaljujući čijoj primeni je prinos biljnih kultura povećan u proseku 2 do 3 puta, nego i u tome, što sam proces fermentacije poboljšava kvalitet biljnog proizvoda. Međutim, znatno manji broj radova je posvećen proučavanju uticaja fermentacije zrnastih plodova žitarica na smanjenje sadržaja pesticida.

Pretpostavka je da će *Lactobacillus plantarum* i *Saccharomyces cerevisiae*, koji su osnova biotehnološkog procesa proizvodnje kiselog testa od žitarica, u izvesnoj meri da razgrade pesticide i tako smanje njihovu koncentraciju u krajnjem proizvodu. Smatra se da će upravo ovi mikroorganizmi efikasno redukovati potencijalnu kontaminaciju pšenice sa pirimifos-metilom, hlorspirifos-metilom i bifentrinom iznad njihovih maksimalno dozvoljenih koncentracija u žitu. U disertaciji je ispitivan uticaj fermentacije pšenice ispitivanim mikroorganizmima na degradaciju rezidua ovih pesticida u znu, kao i uticaj različitih parametara fermentacije (temperatura, trajanje fermentacije i veličina inokuluma) na stepen degradacije ispitivanih pesticida. Takođe, detaljno je ispitivan uticaj ispitivanih pesticida na metabolizam, rast i razvoj mikroroganzama *L. plantarum* i *S. cerevisiae* kao i na proces fermentacije pšenice, što je od značaja i za optimizaciju fermentacionih procesa u slučaju kontaminacije sirovina pesticidima.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U doktorskoj disertaciji citirano je 216 literaturnih navoda, od kojih najveći broj čine najnoviji radovi iz međunarodnih časopisa sa tematikom značajnom za izradu doktorske disertacije. U toku izrade doktorske disertacije kandidatkinja je pregledala dostupnu literaturu vezanu za ispitivanje uticaja tehnika procesuiranja hrane, prvenstveno fermentacionih procesa, na smanjenje nivoa njihove zagađenosti pesticidima. Navedene reference su novijeg datuma i sadrže eksperimentalne rezultate istraživanja mnogih istraživača, analizu i diskusiju dobijenih rezultata i izvedene zaključke o mogućnostima primene ne samo tehnološko zahtevnijih nego i jednostavnijih procesa prerade hrane, u cilju smanjenja količine ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima, što svakako nudi široku perspektivu za pronalazak rešavanja problema zdravstvene nebezbednosti hrane. Iz obrazloženja predložene teme

doktorske disertacije i objavljenih radova koje je kandidat priložio, kao i iz popisa literature koja je korišćena u istraživanju, uočava se poznavanje predmetne oblasti istraživanja i aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu.

3.3. Analiza primenjenih naučnih metoda i njihova adekvatnost za sprovedeno istraživanje

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su mikrobiološke metode za procenu broja prisutnih živih ćelija mikroorganizama u uzorcima i to direktna metoda razređenja tj. zasejavanje ćelija na adekvatne podloge u cilju izračunavanja CFU (Colony Forming Units) parametra i indirektna metoda merenja optičke gustine na 620 nm (O.D.620nm), određena pomoću spektrofotometra (UV-VIS), u vidljivoj oblasti spektra.

U okviru optimizacije fermentacije pšenice odabranim mikroorganizmima korišćena je statistička metoda odzivne površine, tj. Box-Behnken dizajn eksperimenta sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački, i sa tri posmatrana odziva. Faktori i njihovi nivoi pri fermentaciji sa *L. plantarum* i *S. cerevisiae* su: veličina inokuluma (6%, 8%, 10%), trajanje fermentacije (24 h, 48 h, 72 h) i temperatura (23 °C, 30 °C, 37 °C).

Kao metode za utvrđivanje efikasnosti *L. plantarum* u fermentaciji supstrata korišćene su: praćenje promene pH vrednosti, praćenje promene titrabilne kiselosti korišćenjem indikatora (TTA test) i određivanje broja mikroorganizama metodom razređenja (CFU parametar). Odzivi za utvrđivanje efikasnosti *S. cerevisiae* u fermentaciji supstrata su bili: praćenje promene pH vrednosti, određivanje produkcije CO₂ indirektnim merenjem mase fermentisanog supstrata i određivanje broja mikroorganizama metodom razređenja (CFU parametar).

U analitici ostataka pesticida testirane su tri metode pripreme uzoraka u cilju dobijanja adekvatnog prinosa (recovery). Sve tri metode zasnivale su se na metanolsko-acetonskoj (1:1) ekstrakciji, dok su se procedure prečišćavanja dobijenih ekstrakata razlikovale. Prva metoda bila je prečišćavanje kroz kolonu punjenu smešom aluminijum-oksida i aktivnog uglja u kombinaciji sa dihlormetanom kao eluentom, druga prečišćavanje kroz kolonu punjenu florisilom u kombinaciji sa smešom etilacetata i acetona (4:1) kao eluentom, dok se treća zasnivala na kombinaciji prve dve, tj. prečišćavanju kroz kolonu punjenu smešom aluminijum-oksida i aktivnog uglja u kombinaciji sa smešom etilacetata i acetona (4:1) kao eluentom. Promene koncentracija ostataka ispitivanih aktivnih materija u uzorcima praćene su GC-MS spektrometrijom. Za hromatografisanje je korišćena VF-5ms kapilarna kolona, dok je maseni spektrometar radio u EI/SIM modu (Electron Impact/Selected Ion Monitoring), tj. korišćeni su karakteristični fragmentni joni (m/z) za detekciju i kvantifikaciju svake aktivne materije (joni 290 i 233 za pirimifos metil, 286 i 125 za hlörpirifos metil, 181 i 166 za bifentrin).

3.4. Ocena primenljivosti i verifikacija ostvarenih rezultata

Na osnovu pregleda do sada objavljenih eksperimentalnih podataka i rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije ostvaren je značajan doprinos razjašnjavanju mogućnosti korišćenja procesa fermentacije pšenice sa *L. plantarum* i sa *S. cerevisiae* kao efikasnog sredstva za smanjenje kontaminacije pšenice pirimifos-metilom, hlörpirifos-metilom i bifentrinom, iznad njihovih MDK vrednosti. Takođe, istaknut je značaj sterilizacije, tj. izlaganje temperaturi od 121 °C pod pritiskom od 103 kPa u trajanju od 15 min, kao sredstva za redukciju kontaminacije pšenice ispitivanim organofosfatnim pesticidima iznad njihovih MDK vrednosti. Rezultati i zaključci izneti u disertaciji potvrda su mogućnosti korišćenja relativno jednostavnijih procesa prerade hrane u svrhu smanjenja količine ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima. Verifikacija ostvarenih rezultata disertacije postignuta je objavljivanjem u vodećim međunarodnim časopisima iz domena ove problematike.

3.5. Ocena sposobnosti kandidata za samostalan naučni rad

U svom dosadašnjem istraživačkom radu, kandidat mr Tijana Đorđević, dipl. biolog, pokazala je samostalnost i stručnost u pretraživanju literature, pripremi i realizaciji eksperimenata, i tumačenju rezultata istraživanja. Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalan naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

U okviru ove doktorske disertacije ostvaren je značajan doprinos u razumevanju ponašanja mikroorganizama *L. plantarum* i *S. cerevisiae* u prisustvu pirimifos-metila, hlorspirifos-metila i bifentrina, kako u podlogama za rast ovih kultura, tako i u pšeničnom supstratu i utvrđena je razlika u efikasnosti mlečnokiselinske i kvasne fermentacije pšenice kontaminirane i nekontaminirane pomenutim pesticidima.

Rezultati doktorske disertacije daju značajan doprinos u razumevanju uticaja fermentacije pšenice ovim mikroorganizmima na degradaciju ostataka organofosforinih i piretroidnih insekticida, kojima se pšenica tretira u toku uzgoja i skladištenja. Na osnovu dobijenih rezultata ukazano je na mogućnost praktične primene fermentacije kao metode za smanjenje kontaminacije pesticidima.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Istraživanja u okviru ove disertacije su koncipirana na osnovu definisanih ciljeva i detaljne analize literature iz oblasti ispitivanja uticaja tehnika procesuiranja hrane u toku prerade biljnog materijala na smanjenje nivoa zagađenosti pesticidima. U okviru ove doktorske disertacije primenjena je metodologija istraživanja kakva je prethodno opisana u literaturi, ali je prvi put ispitivan uticaj fermentacije *Triticum spelta* primenjenim mikrobiološkim kulturama *L. plantarum* i *S. cerevisiae* na degradaciju pirimifos-metila, hlorspirifos-metila i bifentrina, veoma često korišćenih insekticida na području naše zemlje, a ispitani su i efekti ovih pesticida na njihov rast i fermentativnu aktivnost. Uvidom u dostupnu literaturu iz ove oblasti istraživanja i rezultate istraživanja dobijene u okviru ovoga rada, može se konstatovati da dobijeni rezultati predstavljaju korak ka praktičnoj primeni fermentacije kao sredstva za poboljšanje bezbednosti hrane sa aspekta zagađenosti pesticidima.

4.3. Očekivana primena rezultata u praksi

Rezultati predstavljeni u okviru ove doktorske disertacije potvrdili su uspešnost fermentacionih procesa u redukciji ostataka pesticida u prehrambenim proizvodima.

U okviru ove doktorske disertacije određeni su optimalni uslovi mlečnokiselinske i kvasne fermentacije pšenice u cilju postizanja maksimalnog stepena degradacije pesticida pirimifos-metil, hlorspirifos-metil i bifentrin. Najvažniji zaključak koji se iz ovih istraživanja može izvesti je da oba mikroorganizma u najvećoj meri razgrađuju bifentrin, nešto manje pirimifos-metil, a najmanje hlorspirifos-metil, pri čemu je degradacija pirimifos-metila i bifentrina veća u toku mlečnokiselinske fermentacije, dok je degradacija hlorspirifos-metila veća u toku kvasne fermentacije pšenice. Takođe, istaknut je značaj izlaganja pšenice temperaturi od 121 °C pod pritiskom od 103 kPa u trajanju od 15 min, kao sredstva za redukciju potencijalne kontaminacije pšenice sa ispitivanim organofosfatnim pesticidima iznad njihovih MDK vrednosti. Dodatno, utvrđen je negativan uticaj prisustva sva tri ispitivana pesticida u pšeničnom supstratu na porast brojnosti *S. cerevisiae* i na ukupnu kvasnu fermentaciju pšenice, dok na porast brojnosti *L. plantarum* i efikasnost mlečnokiselinske fermentacije pšenice utiče samo bifentrin i to u manjoj meri.

Najvažniji zaključak koji se iz ovih istraživanja može izvesti je da je u slučaju značajnije kontaminacije pšenice ispitivanim pesticidima za izvođenje efikasne fermentacije potrebno inokulisati supstat sa većom količinom aktiviranog inokuluma.

Prikazani rezultati u okviru ove doktorske disertacije se mogu primeniti i kao osnova za dalja istraživanja u domenu korišćenja fermentacija prehrambenih sirovina u cilju poboljšanja bezbednosti hrane sa aspekta kontaminacije pesticidima.

4.4. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat mr Tijana Đorđević je rezultate iz teze verifikovala objavljivanjem jednog rada u istaknutom međunarodnom časopisu, jednog u časopisu međunarodnog značaja, jednog u časopisu međunarodnog značaja verifikovanog posebnom odlukom i jednog rada u časopisu nacionalnog značaja.

RADOVI OBJAVLJENI U NAUČNIM ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA –M20

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu – M22

T. Đorđević, S. Šiler-Marinković, R. Đurović, S. Dimitrijević-Branković, J. Gajić-Umiljendić “Stability of the pyrethroid pesticide bifenthrin in milled wheat during thermal processing, yeast and lactic acid fermentation, and storage” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, in press (2013). Accepted article published: 19 April 2013. doi:10.1002/jsfa.6188 (Food Science & Technology 47/124, IF (2012) = 1.759) Paper ISSN: 0022-5142; Electronic ISSN: 1097-0010

Rad u međunarodnom časopisu – M23

T.Đorđević, S. Šiler-Marinković, R. Đurović, S. Dimitrijević-Branković, J. Gajić-Umiljendić “Dissipation of pirimiphos-methyl during wheat fermentation by *Lactobacillus plantarum*” *Letters in Applied Microbiology*, in press (2013). 2013/0848: accepted 28 June 2013. doi:10.1111/lam.12128

(Biotechnology & Applied Microbiology 102/159, IF (2012) =1.629) ISSN: 0266-8254

Rad u časopisu međunarodnog značaja verifikovanog posebnom odlukom – M24

T.Đorđević, S. Šiler-Marinković, R. Đurović, S. Dimitrijević-Branković, J.Gajić-Umiljendić “Efficiencies of Different Methods for Determination of Organophosphate Pesticide Residues in Fermented Wheat Substrate“ *Pesticides and phytomedicine*, in press (2013). UDC:543.2:632.95.028 ISSN: 1820-3949

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

5.1.Kratak osvrt na disertaciju u celini

Na osnovu svega napred iznetog, Komisija smatra da doktorska disertacija kandidata Mr Tijane Đorđević, dipl. biologa, pod nazivom „Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita“ predstavlja značajan i originalni naučni doprinos u oblasti biohemijaskog inženjerstva, što je potvrđeno radovima objavljenim u časopisima međunarodnog značaja. Predmet i ciljevi istraživanja su jasno navedeni i ostvareni. Komisija takođe smatra, da doktorska disertacija u potpunosti ispunjava sve zahtevane kriterijume. Kandidat je ispoljio naučno-istraživačku sposobnost i samostalnost u svim fazama izrade ove disertacije.

5.2. Predlog komisije Nastavno-naučnom veću

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću TMF-a da prihvati ovaj Izveštaj i da ga zajedno sa podnetom disertacijom mr Tijane Đorđević, dipl. biologa, pod nazivom „**Uticaj fermentacije na degradaciju ostataka pesticida u fermentisanim proizvodima od žita**” izloži na uvid javnosti u zakonski predviđenom roku i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti prirodnih nauka Univerziteta u Beogradu, kao i da nakon završetka procedure, pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

U Beogradu 21.08.2013.

Komisija

1. Dr Slavica Šiler- Marinković , red. prof., TMF, mentor
2. Dr Rada Đurović-Pejčev, naučni saradnik , Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun, komentor
3. Dr Suzana Dimitrijević- Branković, vanr. prof. TMF