

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број захтева: 32/9-8.2.

Датум: 29.06.2022.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

**за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама**

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

Кандидат **МАРИНА (Петко) ИВАНОВИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: „Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране“

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 08.10.2019. године, својим актом 02-08 Број: 61206-3962/2-19 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **«Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране».**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 30.03.2022. године, одлуком Факултета број 32/6-6.4. у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Зорица Радуловић, редовни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Јелена Миочиновић, редовни професор, Технологија анималних производа, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Душан Живковић, редовни професор, Технологија анималних производа, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
4. др Милица Мирковић, доцент, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. др Татјана Шолевић Knudsen, научни саветник, Хемија животне средине, Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 29.06.2022. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Душан Живковић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/9-8.2.
Датум: 29.06.2022. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 29.06.2022. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **МАРИНА ИВАНОВИЋ, мастер** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«ПОТЕНЦИЈАЛ ПРИМЕНЕ АУТОХТОНИХ БАКТЕРИЈА МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ КАО АНТИЛИСТЕРИЈСКИХ КУЛТУРА У ПРОИЗВОДЊИ ХРАНЕ».**

II Универзитет је дана 08.10.2019. године, актом 02-08 број: 61206-3962/2-19, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у научном часопису који га квалификује за одбрану докторске дисертације:

Ivanovic, M., Mirkovic, N., Mirkovic, M., Miocinovic, J., Radulovic, A., Solevic Knudsen, T., Radulovic, Z. (2021): Autochthonous *Enterococcus durans* PFMI565 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1–4 in Bio-Control of *Listeria monocytogenes* in Ultrafiltered Cheese. Foods, 10(7):1448. <https://doi.org/10.3390/foods10071448>.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ
Датум: 19.04.2022.године

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Марине Ивановић, мастер еколога

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, број 32/6-6.4. од 30.03.2022. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације мастер еколога Марине Ивановић под насловом: *"Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране."*

Комисија у саставу др Зорица Радуловић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Јелена Миочиновић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Душан Живковић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Милица Мирковић, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Татјана Шолевић Knudsen, научни саветник Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду, прегледала је поднету докторску дисертацију и о томе подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Марине Ивановић, мастер еколога, написана је на 99 страна, укључујући 38 табела, 21 график, 8 слика, а цитирано је 204 референце изворне научне литературе. Дисертација садржи сажетак са кључним речима на српском и енглеском језику.

Дисертација садржи следећих 7 поглавља: 1. Увод (стр. 1-2), 2. Преглед литературе (стр. 3-21), 3. Циљ истраживања (стр. 22), 4. Материјал и методе (стр. 23-38), 5. Резултати и дискусија (стр. 39-78), 6. Закључци (стр. 79-82), 7. Литература (стр. 83-99). На крају текста дисертације налазе се Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије рада, Изјава о коришћењу и Биографија кандидата.

2. Приказ и анализа дисертације

Увод – У овом поглављу кандидаткиња је дала кратки осврт на значај спречавања контаминације хране током производње и складиштења. Будући да је један од значајнијих узрочника болести, који се углавном преноси путем хране, а код старије популације, хроничних болесника, трудница, особа са ослабљеним имунитетом, може изазвати теже облике болести, појашњен је значај *Listeria monocytogenes*. С обзиром на

преживљавање овог патогена у неповољним условима окружења, на поседовање специфичних механизма адаптације, способност формирања биофилмова, као пут преноса *L. monocytogenes*, јављају се различити прехранбени производи: меки сир, кобасице, деликатесни производи, плодови мора, месо, салата, воће, поврће.

Основни циљ сваког произвођача хране јесте осигурање безбедности производа, а микробиолошка исправност се махом обезбеђује применом синтетичких средстава и/или агресивних физичких третмана, што утиче на нарушавање сензорног квалитета. Како би сви захтеви били испуњени, неопходно је изналажење алтернативних начина производње, где би развој нових биотехнологија, уз примену природних бактеријских изолата, резултирали производњом високовредних намирница са очуваном сензорним својствима. Природни изолати аутохтоних бактерија млечне киселине (БМК), деловањем својих метаболита са антимикуробним потенцијалом, могу допринети безбедности производа и продужењу његовог рока трајања. Карактеристике метаболизма БМК су продукција једињења са антимикуробним својствима, као што су водоник-пероксид, диацетил, органске киселине, а такође могу настати и производи слични антибиотицима, бактериоцини, рибозомално синтетисани пептиди са малом молекулском масом, који могу спречити раст бактерија изазивача кварења хране и патогена.

Традиционални производи чине богат извор врло значајних изолата аутохтоних сојева БМК, који осим што носе аутохтоност производа, могу допринети и заштити прехранбених производа од патогена. У зависности од специфичности метаболизма инокулата БМК у производњи хране, примена аутохтоних изолата БМК, са доказаним пожељним технолошким особинама, осим очувања традиционално признатих и препознатљивих органолептичких особина производа, допринела би и осигурању исправности производа током рока трајања.

Преглед литературе – Ово поглавље састоји се од 7 потпоглавља. У првом потпоглављу, кандидаткиња се осврнула на заступљеност патогена у храни и са епидемиолошког становишта дала приказ стања на територији Европске уније од 2012. године. Као узрочник тровања храном, дужи низ година предњачи *Campylobacter* sp. Потом следе салмонелозе, јерсиниозе, инфекције Shiga-токсигеном *E. coli* (STEC инфекције). Током 2017. године у Европској Унији, након кампилобактериоза, најучесталије су биле салмонелозе, јерсиниозе, STEC инфекције, а најчешће интоксикације последица су стафилококног тровања храном.

Листериозе, бактеријске цревне инфекције настале као последица конзумирања хране која је контаминирана бактеријама из рода *Listeria*, чине зоонозе које су најређе пријављене, али са највише хоспитализованих лица и процентуално највише смртних исхода. У САД се годишње региструје око 1600 листериоза, док је у ЕУ у 2016. години регистровано 2536 потврђених случајева, са инциденцијом од 0,47% на 100000 становника.

У другом делу потпоглавља дат је приказ стања на територији Републике Србије, где се у периоду 2008 - 2016. године, бележи тренд пада специфичне стопе инциденције оболевања од салмонелоза (посматрано на 100000 становника), док у случају кампилобактериоза и јерсиниоза се бележи тренд раста. Када су у питању зоонозе, за исти период, региструје се тренд пада стопе инциденције. Листериоза се појављивала најчешће у старосној доби изнад 60 година, у 8 случајева, са стопом инциденције 0,11 %

(на 100000 популације), без регистрованих смртних исхода. У 2018. години од листериозе је оболело 6 особа. Током 2019. године, од листериоза је умрло 5 особа.

L. monocytogenes представља узрочника алиментарних тровања са највећим бројем хоспитализованих случајева и смртних исхода, чему у великој мери, доприносе њена распрострањеност у природи и способност раста на температури хлађења. *Listeria* sp. преживљава дуго у неповољним условима, што представља разлог за додатну забринутост произвођача хране и потрошача. Узимајући у обзир да је проценат смртности изазваних овим патогеном 20-30 %, као и чињеницу да је изузетно раширена у окружењу и да лако може контаминирати постројења и уређаје за припрему намирница, *L. monocytogenes* представља реалну опасност у ланцу исхране.

У другом потпоглављу, кандидаткиња је дала приказ актуелне законске регулативе у области контроле *L. monocytogenes* и осврнула се на значај увођења Регулative Европске заједнице № 2073 од 2005. године, која кроз критеријум безбедности и критеријум хигијене процеса, регулише ову област. Према Регулативи, присуство *L. monocytogenes* у готовој храни (ready-to-eat food) у 25 g није дозвољено, уколико се критеријум примењује на храну за одојчад или медицинске потребе. У храни која подржава раст овог патогена одређена је граница од 100 cfu/g током рока употребе, а непосредно пре пуштања у промет, *L. monocytogenes* не сме бити присутна у 25 g. У 2007. години Codex Alimentarius комисија је објавила Водич о примени општих начела хигијене хране за контролу присуства *L. monocytogenes* у готовој храни. Препоручени су начини вршења микробиолошких испитивања, како би се проверила успешност спровођења општих хигијенских мера у објекту који послује са храном, као и успешност контролних мера у објектима у којима је успостављен HACCP или неки други систем за контролу безбедности хране. Законом о безбедности хране 2009. године на територији Републике Србије извршена је верификација међународних стандарда у области безбедности хране, а успостављање и организација система у области безбедности и квалитета хране у складу са Codex alimentarius-ом, постали су обавезујући. У складу са препорукама FAO (Food and Agriculture Organization), WHO (World Health Organization) и WTO (World Trade Organization), прихваћена је анализа опасности и критичних контролних тачака HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) и у Републици Србији. Успостављен је систем процене опасности ризика, чиме је омогућено свим учесницима у процесу производње и промета хране планирање активности према потенцијалном нивоу ризика.

Кандидаткиња напомиње да, како би се успоставила усаглашеност хране са микробиолошким критеријумима, неопходно је у свакој фази производње, прераде и дистрибуције хране, предузимати мере засноване на начелима HACCP-а, уз обавезно спровођење поступака добре хигијенске праксе и добре произвођачке праксе. Субјекти у пословању храном спроводе испитивања према микробиолошким критеријумима, прилагађајући динамику природи и обиму производње. С обзиром да присуство *L. monocytogenes* може представљати опасност по јавно здравље, легислативом је регулисано да се, у објектима у којима се врши припрема хране која погодује њеном расту и развоју, са производне опреме и површина које долазе у контакт са храном у поступку припреме, узимају узорци ради провере присутности овог патогена. Прикупљени подаци у овој области указују на евентуалне пропусте и неправилности при раду, након чега се прибегава корективним мерама ради отклањања истих.

Међу најбитнијим својствима која утичу на преживљавање и размножавање *L. monocytogenes* у храни спремној за конзумирање издвајају се рН, активност воде (a_w), температура и дужина складиштења производа. На преживљавање *L. monocytogenes* у храни, осим тога, могу утицати стартер културе, конзерванси и други инхибитори. У потпоглављу ***Listeria monocytogenes* – опште карактеристике**, кандидаткиња се, након описивања општих услова за преживљавање и раст овог патогена, осврнула на његов епидемиолошки значај као узрочника болести које се преносе храном. Способност причвршћивања *L. monocytogenes* на површину опреме, формирање биофилмова објашњавају њену широку распрострањеност у различитим врстама хране. У другом делу потпоглавља, кандидаткиња наводи да се *L. monocytogenes* може наћи у млечним производима, плодовима мора, сеченом воћу и поврћу, кобасицама, деликатесним производима и сл. Погодан матрикс за развој листерије представљају млечни производи бутер, сиреви од свежег или пастеризованог млека, сиреви у саламури, а забележени су и бројни случајеви тровања храном где је узрочник био овај патоген. Присуство патогена у производима могло би се проузроковати на више начина: неспровођењем или неадекватним спровођењем поступка пастеризације, лошим хигијенским процедурама, унакрсном контаминацијом, сходно чињеници да спровођење пастеризације није увек гаранција за безбедност производа. Кандидаткиња наводи литературне податке контроле хигијенског стања узимањем брисева у погонима за производњу млечних производа, кајмака, где је у високом проценту констатовано присуство *L. monocytogenes*. Такође, забележено је присуство овог патогена у риби, као у преживљавање током више месеци на температури $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, опстајање у смрзнутим и конзервисаним рибљим и морским производима.

У делу **Бактерије млечне киселине** кандидаткиња наводи карактеристике и поделу ове групе микроорганизама, као и специфичности њиховог метаболизма. У наставку, наводећи литературне податке о примени у храни, указује на значај БМК у спречавању кварења хране, раста патогених микроорганизама. Осим конзервишућег дејства, под утицајем метаболита БМК, развијају се специфичне сензорне карактеристике производа, што их чини погоним за примену у својству стартер култура, за производњу сира, јогурта, производа од меса, поврћа, рибе и сл. Осим тога, налазе примену и у својству додатних ("adjunct") култура, односно протективних култура где утичу на очување безбедности самог производа. У потпоглављу **Најважније врсте БМК** кандидаткиња наводи да се према свом значају издвајају: *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp, описујући детаљније лактококе и ентерококе, будући да овим врстама припадају сојеви из предметног истраживања. Наводи да природну средину лактокока чине зелене биљке, сирово млеко, традиционални ферментисани производи, сиреви, кајмак. У производњи млечних производа употребљавају се као појединачне стартер културе или у мешавинама. Кандидаткиња наводи да се дужи низ година сматрало да *Enterococcus* spp. делују неповољно на организам човека, а да су данас широко заступљене у производњи хране у својству пробиотика, стартер култура, "adjunct" култура, базирано на њиховим пожељним особинама, као што су отпорност на жучне соли и желудачну киселину, продукција бактериоцина, ензима, ароматичних једињења и сл. С обзиром на карактеристику неких сојева ентерокока која указује на опасност од преноса резистенције на антибиотике, за

сваки нови сој намењен за прехранбену индустрију неопхоно би било испитати могућност преноса резистенције на антибиотике.

Због својих изузетних особина БМК које су заступљене у производњи хране, кандидаткиња, наводи чињеницу да традиционални производи представљају богат извор врло важних изолата, који се могу успешно користити у производњи ферментисаних млечних производа, сира, меса, поврћа, воћа, житарица, рибе, као протективне и стартер културе. У потпоглављу **Антимикробни продукти метаболизма БМК**, кандидаткиња даје преглед важнијих антимикробних метаболита бактерија млечне киселине. За примену у храни, међу значајнијим продукатима са антимикробним деловањем, издвајају се бактериоцини, који углавном делују на блиско сродне врсте. Одређени представници ове групе имају шири дијапазон деловања, па инхибиторно делују на патогене и бактерије које су узрочници кварења хране, као што су: *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Listeria* sp. и друге. Кандидаткиња наводи да се апликација бактериоцина у храну врши на више начина: додавањем пречишћеног бактериоцина директно у храну, као бактериоцин-продукујуће културе, у виду стартера или уз комерцијални стартер као додатна култура. Такође, могућа је примена додавањем претходно ферментисаних производа који садрже бактериоцин-продукујуће културе у храну, те инкорпорација бактериоцина или бактериоцин-продукујуће културе у биоактивни филм паковања. Наглашавајући безбедносни аспект хране, кандидаткиња указује на могућност њихове примене у сврси протективних култура, чиме би се дао допринос конзервисању ферментисаних производа и осигурала микробиолошка безбедност и у постпастеризационом периоду. Кључну улогу у конзервисању производа, има снижавање рН и нагомилавање органских киселина, као што су млечна, сирћетна, пропионска, као последица метаболизма БМК, с обзиром да кисела средина представља неповољно окружење за раст патогених микроорганизама и микроорганизама који изазивају кварење хране. Изузев што делују као природни конзерванс, органске киселине утичу и на побољшање квалитета ферментисаних производа и продужетак њиховог рока употребљивости. Кандидаткиња наводи литературне податке антимикробног деловања и других метаболита БМК. Значајно инхибиторно дејство, испољавају и масне киселине, при чему, масне киселине кратког ланца, испољавају токсичност у високим концентрацијама на G (-) бактерије, док масне киселине дугог ланца испољавају антимикробно деловање на G (+) бактерије и у малим концентрацијама. Аромогене супстанце диацетил, ацетоин, ацеталдехид, такође, самостално или у комбинацији са другим антимикробним агенсима, могу испољити антимикробну активност. Диацетил има значајну улогу у инхибицији G (-) бактерија, квасаца и плесни, а мање G (+) бактерија, а антимикробна својства испољава само када је заступљен у великим концентрацијама. Одређене врсте БМК имају способност да производе водоник-пероксид, који, у зависности од концентрације и низа других фактора, може испољити бактериостатичке или бактерицидне ефекте према патогенима, те продужити рок трајања прехранбеног производа. Кандидаткиња наводи литературне податке о бољој продукцији H₂O₂ од стране *L. lactis* subsp. *lactis* у односу на *Lactobacilli* spp. Угљен-диоксид ствара анаеробну средину, па тако може утицати негативно по опстанак аеробних форми микроорганизама хране деловањем на ћелијску мембрану. Међу осталим продуктима метаболизма БМК, налази се и етанол, чија улога у антибиози није посебно значајна, будући да је ниво његове продукције минималан. Реутерин има широк спектар

антимикробног дејства и утиче инхибиторно на квасце, плесни, G (+) и G (-) бактерије. Инхибира раст врста бактерија *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Candida*.

У наредном потпоглављу **Примена бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у храни** кандидаткиња наводи да постоје бројни резултати антилистеријског деловања БМК у храни. Применом у различитим врстама производа, као што су млечни производи, месо, риба, различити сојеви БМК испољили су инхибиторно дејство према *L. monocytogenes*. Наведено је антимикробно деловање БМК као бактериоцин-продукујућих култура самостално или у комбинацији са другим факторима контроле патогена, као и деловање бактериоцина БМК у различитим врстама прехранбених производа.

Циљ истраживања - Да би се продужио рок трајања производа и обезбедила његова микробиолошка безбедност, примењују се, углавном, агресивне технике прераде или се производи третирају различитим хемијским средствима. Уместо употребе хемијских конзерванса и добијања производа са природним конзервансима, као адекватно решење намећу се БМК са својим антимикробним метаболитима. С обзиром да ферментисани производи произведени на традиционалан начин, обилују огромним бројем сојева са изузетним карактеристикама и још увек недовољно истраженим механизмима антимикробног деловања, њихова апликација у производњи у својству додатних протективних култура могла би дати изузетан допринос у индустријској производњи безбедних производа, са очуваним традиционалним сензорним особинама.

Применом природних изолата БМК у производњи сира од ултрафилтрираног (УФ) млека, кајмаку, лососу, могли би се очекивати задовољавајући антилистеријски ефекти. Са друге стране, апликацијом аутохтоних сојева у производњи хране, могао би се утврдити њихов утицај на евентуалну промену сензорних својстава производа.

Из наведених разлога, кандидаткиња је навела следеће циљеве дисертације:

- Изолација и карактеризација одабраних сојева бактерија млечне киселине
- Идентификација изолованих сојева БМК
- Прелиминарно испитивање инхибиторног дејства аутохтоних сојева БМК на раст *L. monocytogenes* у моделу сира
- Испитивање утицаја аутохтоних сојева БМК на раст *L. monocytogenes* у различитим концентрацијама у сиру од УФ млека, кајмаку, лососу
- Праћење вијабилности аутохтоних сојева БМК у моделу сира, сиру од УФ млека, кајмаку, лососу у року трајања.

Материјал и методе – Ово поглавље кандидаткиња је поделила у 12 потпоглавља у којима су наведени материјал за рад и следеће методе:

1. У истраживању су коришћене аутохтоне БМК пореклом из традиционалних сирева са територије Републике Србије. Први сој, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 563, изолован из Сјеничког сира са подручја Сјеничко-пештерске висоравни, изолован је и идентификован у ранијим истраживањима. Изолација и идентификација соја *Enterococcus durans* PFMI565 извршена је у току овог истраживања. Трећи сој, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, изолован је из традиционалног сира с подручја планинског дела Источне Србије, ранијим истраживањима. За тестирање антимикробне активности БМК коришћени су сојеви *Listeria monocytogenes* ATCC19111 и *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

2. Из Сјеничког сира, коришћењем селективних подлога, извршена је изолација БМК. Изолати су одабрани на основу инхибиторног деловања према *L. monocytogenes*, те потврде антилистеријске активности коришћењем дифузионе методе са бунарићима. Коришћењем натанта и супернатанта изолата, применом дифузионе методе са бунарићима, а уз употребу кристала проназе Е (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, SAD), тестирана је протеинска природа инхибиторног деловања (Којић et al., 1991). Колоније са показаним антилистеријским деловањем тестиране су на тест каталаза и тест ферментације шећера.

3. Након изолације тоталне ДНК бактеријских изолата, у циљу молекуларне идентификације изолата, извршено је умножавање гена за 16S rDNK коришћењем специфичних прајмера. Након PCR реакције, PCR продукти су пречишћени применом кита за пречишћавање PCR продукта (QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), те проверени на хоризонталној електрофорези коришћењем агарозног гела. Величине PCR продукта утврђене су поређењем са дужинама пређеног пута ДНК фрагмената познате величине (standard, Gene Ruler DNA Ladder Mix, ThermoScientific). Секвенцирање PCR продукта урађено је у центру за секвенцирање Microgen sequencing service, Холандија, а анализа секвенци урађена је у BLAST програму, коришћењем NCBI базе података.

4. Технолошка својства сојева тестирана су испитивањем способности раста при различитим температурама, различитим концентрацијама соли, тестирањем способности продукције егзополисахарида и ацидогене активности.

5. Способност продукције аромогених једињења диацетила и ацетоина, тестирана је Креатинским тестом и реакцијом Voges - Proskauer.

6. Коришћењем гасног хроматографа (GC) Agilent 7890A повезаног са Agilent 7697A уређајем за статичко headspace uzorkovanje (Headspace Static Sampling, HSS) и детектором са захватом електрона (Electron Capture Detector, ECD), анализиран је диацетил као продукт метаболизма БМК. Квантификација диацетила је вршена коришћењем екстерне калибрационе криве.

7. Присуство водоник-пероксида (H_2O_2) као продукта метаболизма БМК тестирано је по модификованој методи Tomás et al. (2004) коришћењем ТМВ агара (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)).

8. Инхибиторна својства селектованих сојева проверена су тестирањем антимикробне активности према *L. monocytogenes* ATCC19111 i *S. aureus* ATCC25923, појединачно или у комбинацијама, коришћењем дифузионе методе са бунарићима (Harris et al., 1989).

9. Испитивање резистенције на антибиотике одабраних сојева аутохтоних БМК, вршено је методом дифузионог теста према упутству произвођача антибиотик дискова Becton Dickinson (BD, SAD). Пре тестирања антимикробног потенцијала селектованих сојева, сојеви су обележени резистенцијом на антибиотике.

10. Ради планиране примене у својству додатних, протективних култура у производњи сирева, рађена је ферментација млека различитим комбинацијама (концентрационим уделима) аутохтоних сојева и комерцијалне стартер културе CHN11 (Chr. Hansen, Данска). На основу мириса, укуса и изгледа груша, за даљи ток истраживања, изабране су комбинације селектованих аутохтоних сојева *E. durans*

PFMI565 и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 и комерцијалне стартер културе CHN11 за примену у производњи сирева од УФ млека.

11. Сојеви су тестирани у моделу сира, производњи сира од УФ млека, кајмаку и лососу. Модел сира је примењен као полазна основа за утврђивање инхибиторног дејства селектованих сојева БМК на раст *L. monocytogenes*. Селекционисани аутохтони сојеви и стартер култура додати су у броју 10^7 cfu/g, а *L. monocytogenes* ATCC19111 у почетним концентрацијама 10^3 , 10^4 , 10^5 cfu/g.

За испитивање антилистеријског дејства селектованих аутохтоних култура, *E. durans* PFMI565 и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 направљено је 16 варијанти сира од УФ млека, коришћењем комерцијалне стартер културе CHN11 у следећим комбинацијама: PFMI565:CHN11 – 1:1; BGBU14:CHN11 – 1:1; BGBU14:PFMI565:CHN11 – 1:1:2 и иницијалним концентрацијама *L. monocytogenes* 10^3 , 10^4 и 10^5 cfu/g. Варијанте сирева без додатка *L. monocytogenes* су сензорно оцењени применом коригованог петобалног бод система.

Исте концентрације *L. monocytogenes* и варијанте са аутохтоним БМК, само без стартер културе, су коришћене су за оглед праћења инхибиторног утицаја БМК у кајмаку и лососу. Одређивање броја *L. monocytogenes* у моделу сира, сиру од УФ млека, кајмаку и лососу вршено је стандардном методом ISO 11290-1, док је праћење вијабилности аутохтоних БМК у сиру од УФ млека, кајмаку и лососу, вршено одређивањем укупног броја методом разређења на одговарајућим селективним подлогама.

12. Коришћењем програма Microsoft Excel 2010, прорачунат је број *L. monocytogenes* у производима, резултати вијабилности БМК и стартер културе, као и оцене сензорних својстава. Статистичка обрада података урађена је коришћењем програма SPSS, док је за одређивање разлика међу експерименталним групама, коришћена двофакторска ANOVA, а Студентов t-тест за поређење разлике између средњих вредности.

Резултати и дискусија – Ово поглавље подељено је у 11 потпоглавља. У потпоглављима који се односе на **Изолацију и карактеризацију сојева**, из Сјеничког сира, произведеног на традиционални начин, изоловано је укупно 200 изолата, да би утврђивањем морфолошких карактеристика селектовано 176 изолата за даљи рад, од којих је 47 изолата одбачено из даље студије након бојења по Грам-у. Антилистеријску активност према *L. monocytogenes* ATCC19111 показало је 20 изолата, при чему су се, зоне инхибиције код 10 изолата кретале између 5 и 6 mm, док је најснажније дејство, са зоном инхибиције 10 mm од зида бунарића, показао изолат PFMI565. С обзиром да је коришћена проназа Е и да није било смањења зоне инхибиције, установљено је да је у питању антимикумно једињење које није протеинске природе. Коришћењем неутралисаног супернатанта и даље је постојала зона инхибиције, нешто смањена, што имплицира да је био изражен утицај органске киселине. Будући да је антимикумна активност постојала и на рН 7, претпоставља се да је присутан утицај још неког антимикумног метаболита. С обзиром да изолат PFMI565 није показао бактериоцинску активност, а да је деловање неког антимикумног метаболита присутно и у неутралисаном супернатанту, у наставку истраживања, испитивани су остали продукти метаболизма који имају антимикумну активност. Три изолата су избачена из даљег истраживања, на основу позитивног резултата каталаза теста, будући да БМК не поседују ензим каталазу. Изолат PFMI565 се показао као каталаза негативан, па је закључено да би могао припадати роду лактокока

или ентерокока. Хетероферментативна ферментација лактозе констатована је код 4 изолата, 2 изолата не ферментишу лактозу, док је само за изолат PFMI565 установљено да има хомоферментативни тип метаболизма.

У потпоглављу **Идентификација селектованог изолата PFMI565**, на основу јаке антилистеријске активности и показаних задовољавајућих биохемијских особина, за даље истраживање селектован је изолат PFMI565, који је идентификован коришћењем молекуларних метода, умножавањем гена за *16s rRNA*. Као матрица је коришћена тотална DNK изолована из изолата PFMI565, а за умножавање конзервираног региона гена *16s rDNA* коришћењем прајмера P1_{16s} и P2_{16s}, као продукт умножавања дела гена *16s rDNA*, добијен је фрагмент од 1000bp. Секвенцирањем и упоредном анализом секвенце коришћењем NCBI базе података, утврђено је да изолат PFMI565 показује 99 % идентичности гена за *16s rRNA* са врстом *Enterococcus durans*.

У наредном поглављу **Тестирање технолошких својстава сојева**, кандидаткиња је показала резултате испитивања раста аутохтоних сојева БМК на различитим температурама, концентрацијама соли, продукцију егзополисахарида и ацидогену способност. Установљено је да сви сојеви расту на температури 15 °C, а ниједан на температури од 45 °C, што је неуобичајено својство, с обзиром да ентерококе преживљавају екстремне услове и могу расти на високим температурама. Установљено је да селектовани сојеви расту при концентрацијама 2, 4 и 6,5 % соли и не продукују егзополисахариде, што их чини погодним за коришћење у производњи сира предвиђеној истраживањем. Током првих 6 сати ферментације сојеви су показали малу ацидогену активност, али, будући да за 24 сата постижу рН између 4,40 (*L. lactis* subsp. *lactis* 563) и 4,73 (*E. durans* PFMI565), могли би се примени као додатне протективне културе. У потпоглављу **Продукција диацетила – гасна хроматографија**, сојеви су тестирани применом статичке head-space гасне хроматографије, при чему су детектоване мале концентрације диацетила, што је било и очекивано, будући да се код све три културе ради о хомоферментативном типу метаболизма угљених хидрата. Може се претпоставити и да је диацетил даље метаболисан до 2,3-бутандиола, а цитрати до пирувата, па до осталих продуката. Најбољу продукцију диацетила испољио је бактериоцински сој BGBU1-4, готово за 50 % већу од осталих сојева из истраживања, што не изненађује с обзиром да се ради о соју који је *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Концентрација диацетила као продукта метаболизма сојева из овог истраживања је доста нижа од раније приказаних минималних концентрација са испољеним антилистеријским деловањем, која по ауторима износи 300 ppm, па се не може очекивати да антилистеријска активност сојева потиче искључиво од диацетила, већ би могла бити резултат синергије више различитих продуката метаболизма. Такође, код сва три соја из истраживања потврђена је продукција водоник-пероксида (H₂O₂), што је детаљније описано у потпоглављу **Продукција водоник-пероксида**. Овакав резултат указује на могућност да испољено антилистеријско деловање може бити последица продукције овог једињења. У потпоглављу **Инхибиторна својства селектованих сојева**, кандидаткиња је, полазећи од претпоставке о антимикуробном деловању сојева на *L. monocytogenes* ATCC19111 и *S. aureus* ATCC25923, испитала њихово инхибиторно деловање, самостално и у комбинацијама. Уочено је слабо антимикуробно дејство селектованих сојева на стафилококе, па су даља истраживања усмерена само на испитивање антилистеријског дејства. Ради планиране примене стартера у комбинацији са селектованим сојевима у производњи сира, испитивано је инхибиторно

деловање према патогенима комерцијалне стартер културе CHN 11 (CHR Hansen, Данска) (*Lc.lactis* subsp. *cremoris*, *Lc.lactis* subsp. *lactis*, *Lc.lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc*), при чему није уочена зона инхибиције комерцијалног стартера према тест патогенима. Самостално, сој *L. lactis* subsp. *lactis* 563 није испољио дејство према патогеним бактеријама, нити је у комбинацији са друге две аутохтоне културе показао позитиван утицај на јачину инхибиције и величину зоне, већ се примећује смањење зоне инхибиторног деловања према *L. monocytogenes*, што је био разлог за искључивање овог соја из даљег истраживања. Најбоље инхибиторно деловање према *L. monocytogenes* показали су сојеви *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 и *E. durans* PFMI565, који су селектирани за даља истраживања. Потпоглављем **Резистенција на антибиотике**, кандидаткиња приказује резултате тестирања сојева *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 и *E. durans* PFMI565 на антибиотике. Утврђено је да је *E. durans* PFMI565 резистентан на стрептомицин и у мањој мери на гентамицин и неомицин, док је сензитиван на антибиотике значајне у клиничкој пракси: ампицилин, ванкомицин, тетрациклин, пеницилин, еритромицин, хлорамфеникол. Најчешћи разлог резистенције на ове антибиотике, последица је поседовања променљивих генетичких елемената одговорних за трансмисију детерминанти резистенције. С обзиром да ентерококе обично поседују хромозомално енкодиране ензиме, који су одговорни за резистенцију на аминокликозиде, међу које се убрајају неомицин, стрептомицин и гентамицин, пренос гена резистенције би био готово немогућ. Сој *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 није показао резистенцију ни на један тестирани антибиотик. Овакви резултати тестирања указују на могућност примене у производњи сира као додатне културе с обзиром на одсуство ризика по пренос гена антибиотске резистенције. У потпоглављу **Ферментација млека**, испитана је активност сојева за примену у производњи сира, најпре кроз њихову активност у млеку. Након 24 h ферментације деловањем испитиваних сојева у различитим комбинацијама са стартер културом CHN11, утврђена је способност ацидификације и вијабилност ћелија, а ферментисана млека су визуелно описана (изглед, конзистенција груша, мирис). Постигнута је добра ацидификација за све испитиване варијанте, са вредностима у опсегу 4,20 - 4,80. На основу оцено груша изабране су обе аутохтоне културе у следећим комбинацијама са комерцијалном CHN11: PFMI565:CHN11 – 1:1; BGBU14:CHN11 – 1:1; BGBU14:PFMI565:CHN11 – 1:1:2. На основу прелиминарних испитивања, у потпоглављу **Испитивање антилистеријског ефекта одабраних сојева у храни**, кандидаткиња је представила резултате истраживања која су вршена у моделу сира, у производњи сира од УФ млека, кајмаку и лососу.

Као полазна основа за утврђивање инхибиторног дејства селектираних сојева на раст *L. monocytogenes* примењен је модел сира. Аутохтони сојеви BGBU1-4 и PFMI565 су испољили инхибиторну активност према *L. monocytogenes* у свим варијантама, са најбржим и најбољим ефектом забележеним у узорцима са концентрацијом *L. monocytogenes* 10^3 cfu/g, где је, до 14. дана, деловањем оба соја, забележено снижавање броја *L. monocytogenes* испод 10^2 cfu/g, што задовољава Критеријум о безбедности хране. У варијанти са комерцијалном стартер културом забележен је пад од једне логаритамске јединице до краја експерименталног периода, а у контролној варијанти вредност патогена се задржала на нивоу 3 логаритамске јединице. Пад испод нивоа од 10^2 cfu/g, у варијантама са иницијалном концентрацијом *L. monocytogenes* 10^4 cfu/g, деловањем

комбинације оба аутохтона соја, забележен је 21. дана, са статистички значајном разликом у односу на контролни узорак и узорак са комерцијалним стартером. У 21. дану, у варијантама са почетном *L. monocytogenes* 10^5 cfu/g, констатован је највећи пад у броју патогених ћелија, при чему су аутохтони сојеви постигли снижење од 4,21 log, у односу на почетни број, за *E. durans* PFMI565_{str} и 3,89 log за BGBU1-4_{rif}. На крају експерименталног периода, 35. дана, у варијантама са иницијално додатим 10^3 и 10^4 cfu/g *L. monocytogenes*, није било присуства овог патогена, док се, у варијанти са 10^5 cfu/g *L. monocytogenes*, број патогених ћелија задржао на нивоу од 10^1 cfu/g.

Праћењем антилистеријске активности у сиру од УФ млека, у узорцима са све три почетне концентрације *L. monocytogenes*, евидентирано је смањење броја патогених ћелија деловањем аутохтоних култура током складиштења. У варијантама са најмањом почетном концентрацијом листерије, у узорцима са BGBU1-4_{rif} и комбинацијом сојева PFMI565_{str} и BGBU1-4_{rif}, 21. дана, постигнути су најбољи резултати са бројем патогених ћелија на нивоу 10^1 cfu/g *L. monocytogenes*. Уколико се упореде резултати антилистеријског деловања PFMI565_{str} и BGBU1-4_{rif}, може се приметити нешто спорије деловање сојева у сиру од УФ млека, него у моделу сира. У варијантама сирева са иницијалном концентрацијом листерије 10^4 cfu/g, најбољи резултати антилистеријске активности забележени су у узорцима са BGBU1-4_{rif}, где је 21. дана постигнуто снижење броја патогених ћелија за 3,35 логаритамске јединице, што је за 1 log боље у односу на остале узорке са аутохтоним сојевима БМК. Добијени резултат се подудара са резултатима антилистеријске активности соја BGBU1-4_{rif} у моделу сира, а што је за 2 логаритамске јединице боље у односу на сир са комерцијалном стартер културом. До краја експерименталног периода, у свим узорцима са аутохтоним сојевима БМК, њиховим антилистеријски деловањем, снижен је број ћелија *L. monocytogenes* до законски прихватљиве вредности (10^2 cfu/g).

У варијантама сирева са *L. monocytogenes* иницијално додате у концентрацији 10^5 cfu/g, уочава се значајан пад у броју ћелија *L. monocytogenes*, у 14. дану за 2,68 логаритамских јединица у варијанти сира са BGBU1-4_{rif}, а слично антилистеријско дејство је показала мешавина аутохтоних изолата. Забележена је боља антилистеријска активност варијанте BGBU1-4_{rif} и мешавине BGBU1-4_{rif} + PFMI565_{str} у односу на PFMI565_{str} у 21. дану праћења. У узорцима са инокулисаним BGBU1-4_{rif} и BGBU1-4_{rif} + PFMI565_{str}, број *L. monocytogenes* је снижен до 10^1 cfu/g, док је у варијанти са PFMI565_{str} забележено снижење до 10^2 cfu/g. Број ћелија *L. monocytogenes* се након 35. дана складиштења, у варијантама са аутохтоним сојевима, кретао у вредностима 1,20 - 2,03 log, док је у контролној варијанти забележена вредност 4,10 log. Утврђено је да се деловањем аутохтоних сојева BGBU1-4_{rif} и PFMI565_{str}, постиже добра антилистеријска активност у сиру од УФ млека, а најбоље деловање показао је сој BGBU1-4_{rif} у узоцима са почетним бројем *L. monocytogenes* 10^3 cfu/g. До краја експерименталног периода, у свим узорцима са аутохтоним сојевима БМК, снижен је број ћелија *L. monocytogenes* до законски прихватљиве вредности (10^2 cfu/g), осим у случају примене PFMI565_{str} при иницијалној концентрацији *L. monocytogenes* 10^5 cfu/g.

Сензорна анализа је показала да су сви сиреви са додатим аутохтоним сојевима, добили високе оцене, са значајном разликом у односу на сир произведен применом само комерцијалне стартер културе. Оцене изгледа сирева са примењеним аутохтоним културама су се кретале у вредностима 4,90 - 5,00. Уочене су разлике између контролних

узорака сира и варијанти са аутохтоним сојевима, при чему је сир са примењеном само комерцијалном starter културом, био мазивији и мекше конзистенције. Што се тиче укуса, оцењивачи су у случају контролног сира, дали нешто ниже оцене у односу на варијанте са аутохтоним БМК, а укус су оцењивали као киселији и палећи. Мирис свих сирева је оцењен високим оценама. Варијанте сирева са PFMI565_{str} и BGBU1-4_{tif} у комбинацији са комерцијалним starterом, су показале добра сензорна својства, са процентом од максималног квалитета 84,40 - 94,60 %, знатно вишим него у односу на сир са комерцијалном starter културом, где се кретао у опсегу 56,40 - 85,90 %. Може се сматрати да је примена аутохтоних сојева PFMI565_{str} и BGBU1-4_{tif}, као додатних култура, позитивно утицала на развој сензорних својстава сира од УФ млека.

Применом аутохтоних БМК у кајмаку, без обзира на почетну концентрацију патогена, добијени су бољи резултати у поређењу са контролом, док су најбољи постигнути 7 - 14. дана. Комбинација BGBU1-4_{tif} + PFMI565_{str} у варијантама са *L. monocytogenes* 10³ cfu/g својим инхибиторним деловањем снизила је број патогена за 1,21 log. И појединачно примењени аутохтони сојеви постигли су снижење броја патогена до нивоа прописаног Критеријумима безбедности хране. Слично као и у моделу сира, у кајмаку у узорцима са сојевима BGBU1-4_{tif} + PFMI565_{str} смањен је број ћелија листерије до 10¹ cfu/g у 14. дану (иницијално 10³ cfu/g), док је у сиру од УФ млека та вредност постигнута 21. дана. И у случају варијанти кајмака са иницијалном концентрацијом *L. monocytogenes* 10⁴ cfu/g, највећи пад забележен је у периоду 7 - 14. дана, у ком су варијанте са PFMI565_{str} и PFMI565_{str} + BGBU1-4_{tif} утицале на смањење броја патогена од 1,78 и 1,42 log. У 28. дану најбоља антилистеријска активност забележена је деловањем комбинације аутохтоних PFMI565_{str} + BGBU1-4_{tif}, где је постигнута вредност за ~ 2,2 log нижа од вредности броја *L. monocytogenes* у контролном узорку кајмака.

Узорке са почетним бројем ћелија *L. monocytogenes* 10⁵, од 0. до 21. дана складиштења, на недељном нивоу, одликује пад броја ~ 1 log cfu/g. Последњег, 28. дана број ћелија *L. monocytogenes* у варијантама са аутохтоним БМК, је био на нивоу 10² cfu/g, при чему је варијанта са PFMI565_{str} постигла нешто бољи ефекат, смањујући број листерије на 2,42 log, а варијанта са комбинацијом на 2,82 log јединице, тако да, вредност прописана Критеријумима безбедности хране није постигнута до краја експерименталног периода.

Што се тиче примене селектованих сојева у лососу, у варијантама са BGBU1-4_{tif} добијени су бољи резултати у односу на узорак са PFMI565_{str}. Варијанте са најмањом концентрацијом листерије, карактеришу најбољи резултати антилистеријске активности у 3. дану са смањењем броја ћелија *L. monocytogenes* за 1 log деловањем BGBU1-4_{tif} + PFMI565_{str}, са постизањем нивоа 10² cfu/g који се задржао до краја експерименталног периода. PFMI565_{str} је у 3. дану утицао на смањење броја листерије за 0,23 log, а затим, од 7. дана, бележи се пораст броја, постижући вредност од 10³ cfu/g *L. monocytogenes*, која се задржала до краја експеримента. Највећи пад броја патогених ћелија у узорцима са иницијалним бројем *L. monocytogenes* 10⁴ cfu/g, 3. дана проузроковао је PFMI565_{str}, смањењем до 10³ cfu/g, док је у осталим варијантама са аутохтоним сојевима БМК, пад до нивоа 10³ cfu/g евидентиран 7. дана. Крај периода складиштења, карактерише број 10³ cfu/g *L. monocytogenes* у свим варијантама. Пад од ~ 1 логаритамске јединице уочен је у периоду 0 - 3. дана деловањем аутохтоних култура у свим узорцима лососа са почетним бројем *L. monocytogenes* 10⁵ cfu/g, а највеће смањење забележено је у узорцима са комбинацијом БМК. Од 3 - 7. дана, највећи пад десио се под утицајем PFMI565_{str}, након

чега следи пораст броја ћелија *L. monocytogenes*, за ~ 1 log до 15. дана. Последњег дана читавања, најбољу инхибицију показала је комбинација сојева, са смањењем броја патогених ћелија за ~ 2 log-a. Међутим, на основу резултата може се уочити да су селектовани сојеви БМК најслабије дејство према *L. monocytogenes* показали у средини као што је лосос.

Праћењем вијабилности селектованих сојева, може се уочити да се број тестираних аутохтоних сојева одржавао на високом нивоу у свим узорцима испитиване хране. У сиру од УФ млека уочена је боља вијабилност аутохтоног соја BGBU1-4_{rif} у односу на PFMI565_{str} где се број лактокока у последњој тачки мерења кретао $\sim 8,7$ log cfu/g, док је забележен пад броја ентерокока од почетних $\sim 8,5$ до $\sim 7,5$ log. У узорцима кајмака, до краја периода складиштења, број ентерокока се одржавао на $\sim 8,5$ до $\sim 8,7$ log cfu/g, а број лактокока се кретао у опсегу вредности $\sim 8,41$ до $\sim 8,52$ log. Током периода складиштења лососа, преживљавање лактокока било је боље од преживљавања ентерокока, а број се, на крају експерименталног периода, кретао $\sim 8,23$ до $\sim 8,32$ log cfu/g, у односу на број ентерокока који је износио $\sim 7,56$ до $\sim 7,65$ log cfu/g. Разлика у вијабилности сојева могла би представљати један од разлога за евидентирано боље антилистеријско деловање лактокока у односу на ентерококе у лососу.

Закључци – У закључном разматрању кандидаткиња је сумирала резултате у следећим ставовима:

Из традиционалних сирева који су произведени на територији Републике Србије, изоловано је укупно 200 сојева, од којих је 10 % показало инхибиторно дејство према *L. monocytogenes*. На основу показаног интензитета антилистеријског деловања, изабран је изолат PFMI565, који је накнадно идентификован као *Enterococcus durans*. Истраживању су придружена и два соја БМК, такође из традиционалних сирева, из ранијих истраживања: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 563 и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4.

Испољивањем слабе ацидогене активности у млеку, у првих 6 h, закључено је да нису погодни за примену у својству стартер културе, али да постоји добар потенцијал за примену у производњи сира као додатне протективне културе.

Продукција диацетила потврђена је код сва три соја и износила је: $10,42 \pm 0,07$ $\mu\text{g/L}$ за *L. lactis* subsp. *lactis* 563; $15,07 \pm 2,42$ $\mu\text{g/L}$ за *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4; $11,46 \pm 0,16$ $\mu\text{g/L}$ за *E. durans* PFMI565 – што је, знатно ниже од најниже концентрације која је испољила антилистеријско деловање (300 ppm).

Код сва три соја детектована је позитивна реакција на продукцију водоник-пероксида, па би антилистеријски ефекат могао потицати и од овог једињења.

Тестирањем антимикубног деловања селектованих аутохтоних БМК, применом *L. lactis* subsp. *lactis* 563 у комбинацији са осталим сојевима, примећено је смањење зоне инхибиторног деловања према *L. monocytogenes*, па је, овај сој искључен из даљег истраживања.

Сојеви БМК су испитивањем на антибиотску резистенцију, показали добре резултате. Утврђено је да је сој *E. durans* PFMI565 испољио резистенцију на стрептомицин, гентамицин и неомицин, док је зона инхибиције, која указује на сензитивност соја, уочена код антибиотика, изузетно значајних у клиничкој пракси: ампицилина, ванкомицина,

тетрациклина, пеницилина, еритромицина и хлорамфеникола. Сој *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 је испољио сензитивност на све тестиране антибиотике.

Тестирањем антилистеријског деловања селектованих сојева у различитим врстама хране, моделу сира, сиру од УФ млека, кајмаку, лососу, сојеви су испољили инхибиторну активност у свим матриксама.

У моделу сира, аутохтони сојеви BGBU1-4 и PFMI565 су испољили антилистеријску активност у свим варијантама, без обзира на иницијалну концентрацију *L. monocytogenes*. Најбрже и најбоље дејство оба соја је постигнуто у узорцима са најнижом концентрацијом *L. monocytogenes* 10^3 cfu/g 14. дана, а у узорцима са 10^4 и 10^5 cfu/g је постигнуто 21. дана, снижавајући број *L. monocytogenes* испод нивоа од 10^2 cfu/g, што се значајно разликовало у односу на узорке са комерцијалном стартер културом и контролном варијантом.

Антилистеријска активност, у сиру од УФ млека, у варијантама са све три почетне концентрације *L. monocytogenes*, је показала смањење броја патогених ћелија током складиштења. Најбољи резултат у односу на контролни сир, постигнут је 21. дана и то у варијантама са концентрацијом *L. monocytogenes* 10^3 cfu/g, у узорцима са примењеним BGBU1-4_{rif} и комбинацијом сојева PFMI565_{str} + BGBU1-4_{rif}, а у варијантама сирева са 10^4 cfu/g *L. monocytogenes* са примењеним сојем BGBU1-4_{rif}, при чему је број *L. monocytogenes* пао на ниво 10^1 cfu/g, са трендом опадања до краја периода праћења, што је за 2 логаритамске јединице боље у односу на сир са комерцијалном стартер културом.

У варијантама сирева са *L. monocytogenes* додате у концентрацији 10^5 cfu/g постигнуто је снижавање броја патогених ћелија у узорцима са BGBU1-4_{rif} и мешавине BGBU1-4_{rif} + PFMI565_{str}, у 21. дану, док је у варијанти са PFMI565_{str} постигнуто слабије снижење до 10^2 cfu/g.

Може се закључити да се деловањем аутохтоних сојева BGBU1-4_{rif} и PFMI565_{str}, постиже добра антилистеријска активност у сиру од УФ млека, а најбоље деловање показао је сој BGBU1-4_{rif} у узорцима са почетним бројем *L. monocytogenes* 10^3 cfu/g.

Сензорна оцена сирева је показала да су сви сиреви са аутохтоним сојевима примењеним у својству додатних култура, добили високе оцене, са процентом од максималног квалитета 84,40 - 94,60 %, док је сир са комерцијалним стартером имао значајно лошије оцене, са процентом максималног квалитета у опсегу 56,40 - 85,90 %, па се може закључити да примена сојева PFMI565_{str} и BGBU1-4_{rif} као додатних култура, има позитиван утицај на развој сензорних својстава сира од УФ млека.

Тестирањем антимикробне активности аутохтоних сојева у кајмаку, без обзира на почетну концентрацију *L. monocytogenes*, све варијанте са аутохтоним сојевима су показале боље антилистеријско деловање у односу на контролу. Код свих варијанти кајмака, најбољи резултати постигнути су 7 - 14. дана у све три варијанте примењених аутохтоних сојева, појединачно или у мешавини, са почетном концентрацијом *L. monocytogenes* 10^3 cfu/g, при чему је постигнуто снижавање броја патогена на ниво 10^1 cfu/g, што одговара Критеријумима безбедности хране, а највећи пад броја *L. monocytogenes* од 1,21 log је постигнут применом комбинације сојева BGBU1-4_{rif} + PFMI565_{str}. У истом периоду у варијантама кајмака са почетном концентрацијом *L. monocytogenes* 10^4 cfu/g, су постигнуте вредности броја *L. monocytogenes* од 10^1 cfu/g применом соја PFMI565_{str} и комбинације BGBU1-4_{rif} + PFMI565_{str}, са смањењем броја ћелија *L. monocytogenes* од 1,78 и 1,42 log.

Тренд пада броја ћелија *L. monocytogenes* настављен је до последњег дана експеримента, са статистички значајном разликом броја патогена у узорцима са аутохтоним сојевима, у односу на контролни узорак кајмака. У варијантама кајмака са почетним бројем ћелија *L. monocytogenes* 10^5 cfu/g, иако је утврђено снижавање броја патогена за око 1 log недељно, до краја експеримента, у 28. дану број патогена је остао на нивоу 10^2 cfu/g, што није задовољило Критеријум безбедности хране.

У варијантама узорака лососа, најбољи резултати су постигнути у узорцима са најмањом почетном концентрацијом *L. monocytogenes* 10^3 cfu/g, под утицајем комбинације сојева BGBU1-4_{rif} + PFMI565_{str}, у 3. дану, са смањењем броја ћелија *L. monocytogenes* за 1 log, постижући ниво од 10^2 cfu/g на ком се задржао до краја експеримента. У варијанти лососа са BGBU1-4_{rif}, број патогена је у 11. дану снижен на ниво од 10^2 cfu/g, а у варијанти са PFMI565_{str}, број ћелија *L. monocytogenes* је остао на нивоу од 10^3 cfu/g од почетка до краја експеримента. Овај ниво броја *L. monocytogenes* се задржао у свим варијантама лососа са осталим почетним концентрацијама *L. monocytogenes* 10^4 cfu/g и 10^5 cfu/g до краја периода складиштења, па се генерално може извести закључак да су селектовани аутохтони сојеви испољили слабије инхибиторно деловање према *L. monocytogenes* у узорцима лососа, чиме нису задовољени Критеријуми безбедности хране.

Број тестираних аутохтоних сојева се одржавао на високом нивоу у свим узорцима хране. У сиру од УФ млека, утврђена је боља вијабилност BGBU1-4_{rif} у односу на PFMI565_{str}, где се последњег дана праћења, број лактокока кретао $\sim 8,7$ log, а ентерокока $\sim 7,5$ log. У узорцима кајмака, до краја експерименталног периода, број ентерокока се одржавао на $\sim 8,5$ до $\sim 8,7$ log, а лактокока од $\sim 8,41$ до $\sim 8,52$ log. Преживљавање лактокока у лососу било је боље $\sim 8,23$ до $\sim 8,32$ log у односу на ентерококе $\sim 7,56$ до $\sim 7,65$ log, на крају експеримента.

Литература – У дисертацији је на правилан начин цитирано 204 научна извора који у потпуности одговарају проблематици која је изучавана.

Закључак и предлог

Докторска дисертација Марине Ивановић, мастер еколога, под насловом "*Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране*", представља оригиналну, самосталну и заокружену научно-истраживачку целину.

Програмом ове дисертације обухваћено је испитивање антилистеријског деловања аутохтоних сојева бактерија млечне киселине, њихова примена као протективних додатних култура у сиру од УФ млека, кајмаку, лососу, те њихов утицај на сензорни квалитет производа.

Примењујући савремене, адекватне методе и технике, Марина Ивановић је, у оквиру постављеног циља и програма рада, веома успешно обавила експериментални део истраживања, што је и документовала резултатима дисертације. Дискусију резултата је водила успешно, коментаришући и упоређујући сопствене резултате са резултатима других аутора. Закључци су добро изведени и у сагласности су са добијеним резултатима и вођеном дискусијом.

Дисертација је писана јасним језиком и прегледно, а такође и технички веома добро уређена и организована.

Закључујемо да ова дисертација представља заокружену научну целину испитивања антилистеријског деловања аутохтоних сојева бактерија млечне киселине, њихове примене као протективних додатних култура у сиру од УФ млека, кајмаку, лососу, као и њиховог утицаја на сензорни квалитет производа.

Сматрамо да је проблематика коју је докторанткиња обрадила и експериментално испитала у поднетој дисертацији веома значајна, а добијени резултати и њихово тумачење представљају значајан допринос науци и пракси.

Имајући све ово у виду, предлажемо Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да усвоји позитивну оцену докторске дисертације мастер еколога Марине Ивановић под насловом *"Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране"* и позове је да је јавно брани.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Београд,
19.04.2022. године

Др Зорица Радуловић, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Технолошка микробиологија

Проф. др Јелена Миочиновић, редовни професор,
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Технологија анималних производа

Проф. др Душан Живковић, редовни професор,
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Технологија анималних производа

др Милица Мирковић, доцент,
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Технолошка микробиологија

Др Татјана Шолевић Knudsen, научни саветник,
Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду
Ужа научна област: Хемија животне средине

Прилог

Објављен рад Марине Ивановић, мастер еколог, у научном часопису на SCI листи:

Ivanovic, M., Mirkovic, N., Mirkovic, M., Miocinovic, J., Radulovic, A., Solevic Knudsen, T., Radulovic, Z. (2021): Autochthonous *Enterococcus durans* PFMI565 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1–4 in Bio-Control of *Listeria monocytogenes* in Ultrafiltered Cheese. Foods, 10(7):1448. <https://doi.org/10.3390/foods10071448>.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Датум: 19.04.2022. године

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate, којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације *"Потенцијал примене аутохтоних сојева бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране"*, аутора Марине Ивановић, мастера, констатујем да утврђено подударање текста износи 11%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата истраживања докторанда, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ментор

др Зорица Радуловић, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет