

**НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум:

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Милице Мирковић, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду бр. 33/7-4.9. од 30.03.2016. године, именована је Комисија за оцену урађене докторске дисертације дипл. инж. Милице Мирковић, под насловом "Примена и вијабилност аутохтоних спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине у храни и гастроинтестиналним условима" у саставу: др Зорица Радуловић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Виктор Недовић редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Бојана Богович Матијашић, научни саветник Биотехничког факултета Универзитета у Љубљани, Словенија, др Јелена Миочиновић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Марица Ракин, ванредни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду

На основу анализе приложене докторске дисертације подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Милице Мирковић, под насловом "Примена и вијабилност аутохтоних спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине у храни и гастроинтестиналним условима" написана је на 241 стране (проред 1,5) у оквиру којих се налази 33 табеле, 34 графика, 14 слика и 3 шеме. У докторској дисертацији је цитирано 313 извора литературе. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику, Садржај, Текст по поглављима, Литературу, Списак скраћеница, Изјаве и Биографију аутора. Текст дисертације садржи

следећа поглавља: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-59), Циљеви рада (стр. 60-61), Материјал и методе (стр. 62-90), Резултати и дискусија (стр. 91-193), Закључци (стр. 194-200) и Литература (стр. 201-241). Поред наведеног садржи: Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штапане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

У поглављу **Увод** кандидаткиња је најпре дала опис о појму функционалне хране и разлозима њене све веће популарности, као и општим карактеристикама пробиотских бактерија, пореклу и критеријумима за селекцију пробиотика.

Кандидаткиња је посебно обратила пажњу на начине заштите пробиотских бактерија, где се првенствено користи процес микроинкапсулације. Као један од најчешће коришћених техника микроинкапсулације кандидаткиња наводи процес спреј сушења. Поред описа основних карактеристика спреј сушења, наводе се и начини одређивања вијабилности пробиотских ћелија након спреј сушења. Такође, кандидаткиња наводи различите примере примене пробиотских бактерија у производњи великог броја прехранбених производа, где се издвајају ферментисани производи од млека, првенствено јогурт, а потом и сиреви као погодни медијум за инкорпорацију пробиотских бактерија. Међутим, све већа примена је заступљена и у производњи различитих немлечних производа, где кондиторски производ, на првом месту чоколада, представља погодан прехранбени производ за примену пробиотских бактерија. Такође, наводи се да пробиотске бактерије не смеју да утичу на сензорни квалитет прехранбеног производа. Поред тога, кандидаткиња наводи да је веома битно да пробиотици преживе у одговарајућем броју у гастроинтестиналном (ГИ) тракту, како би оствариле терапеутски ефекат на здравље домаћина. У том смислу, одабир одговарајућег прехранбеног производа који обезбеђује неопходну заштиту пробиотским бактеријама, представља погодан носач пробиотика током пролаза кроз ГИ тракт. На крају уводног дела кандидаткиња указује на велику разноврсност аутохотних потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине изолованих из традиционалних сирева, важност њихове заштите процесом спреј сушења и примене у производњи јогурта, сира од ултрафилтрираног млека и црне чоколаде. Кандидаткиња истиче да испитивање наведених прехранбених производа у улози носача пробиотских бактерија, такође има велику важност. На тај начин, може да се утврди који прехранбени производ представља најпогоднији носач пробиотских бактерија, који обезбеђује неопходну заштиту пробиотцима током складиштења производа, али и током пролаза кроз гастроинтестинални тракт.

Поглавље **Преглед литературе** састоји се од осам (8) подпоглавља у којима су описани до сада објављени резултати других аутора који су директно или индиректно везани за предмет проучавања ове докторске дисертације, као и за методолошке приступе који су коришћени. Прво подпоглавље почиње са разматрањем основних карактеристика бактерија млечне киселине, њихових најзначајнијих родова који су остварили примену у прехранбеној индустрији, са посебним освртом на род лактобацила (*Lactobacillus*), с обзиром на то да највећи број пробиотских бактерија припада наведеном роду. У следећем подпоглављу су указане неке од основних функција ГИ тракта, описани су органи за варење и њихова микрофлора, значај микрофлоре ГИ тракта на здравље домаћина, али и утицај појединих фактора на састав микроорганизама ГИ тракта. Кандидаткиња у наредном поглављу разматра пробиотске бактерије, наводи њихову

дефиницију и основне критеријуме за селекцију пробиотских бактерије у које се убрајају општи (порекло, GRAS статус, стабилност соја, итд.), физиолошки (способност адхезије, имуностимулација, антимикробно дејство, и друго) и технолошки критеријуми (технолошке карактеристике, интеракција са другим микроорганизмима, сензорне карактеристике пробиотских производа, итд.). Сваки од појединачних критеријума је детаљно објашњен, при чему је истакнут значај сваког критеријума уз преглед истраживања других аутора. Такође, кандидаткиња наводи да се већина критеријума испитује у *in vitro* условима, као вид прелиминарних испитивања пробиотских карактеристика.

Након пробиотских критеријума, кандидаткиња наводи литературне податке из области здравствених ефеката пробиотских бактерија, као и многобројне примере позитивних ефеката пробиотских бактерија на здравље домаћина. Будући да је већина пробиотика хуманог порекла, у овом поглављу је истакнут и потенцијал аутохтоних потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине изолованих из традиционалних производа, где су наведени примери из литературе о великом броју селекционих сојева са потенцијалним пробиотским карактеристикама.

Прегледом литературе је обухваћен и процес микроинкапсулације као један од видова заштите пробиотских бактерија током производње и складиштења прехранбених производа, али и током пролаза пробиотских бактерија кроз неповољне услове GI тракта. У овом поглављу, наводе се различите технике микроинкапсулације, при чему је детаљније објашњена техника спреј сушења. С обзиром на то да се током процеса спреј сушења успоставља висока температура, може доћи до оштећења одређеног броја пробиотских ћелија, због чега се наводи да су методе одређивања вијабилности спреј сушених пробиотских ћелија од велике важности.

У наредном поглављу, кандидаткиња наводи примере примене пробиотских бактерија у прехранбеним производима, где се на првом месту наводе ферментисани производи од млека као најчешће коришћени медијуми за примену пробиотика, са посебним освртом на јогурт, а потом примери примене пробиотика у производњи сирева, али и у производњи чоколаде као представника немлечних производа. У овом поглављу наведени су бројни литературни подаци примене пробиотских бактерија у производњи других прехранбених производа.

У последњем поглављу кандидаткиња представља испитивање способности преживљавања пробиотских бактерија у GI условима помоћу *in vivo* тестова, њихов значај и преглед резултата различитих студија пробиотских бактерија и њихова способност колонизације GI тракта.

У поглављу **Циљ рада**, кандидаткиња је истакла неколико циљева: изолација, карактеризација и идентификација аутохтоних бактерија млечне киселине изолованих из традиционалних сирева, потом селекција сојева са потенцијалним пробиотским карактеристикама и њихова микроинкапсулација процесом спреј сушења. Такође, наводи се да је један од циљева и испитивање утицаја спреј сушења на вијабилност и пробиотске карактеристике аутохтоних потенцијалних пробиотских бактерија. Као циљ ове докторске дисертације наводи се и испитивање вијабилности потенцијалних пробиотских бактерија у прехранбеним производима и њихов утицај на сензорне карактеристике током складиштења производа. С обзиром на то да се помоћу *in vivo* тестова може утврдити способност преживљавања потенцијалних пробиотских бактерија у гастроинтестиналним условима, као један од циљева докторске дисертације се наводи испитивање ове способности селекционисаних аутохтоних спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија, при чему се испитивала и улога носача прехранбених производа, као што су јогурт, сир од ултрафилтрираног (УФ) млека и црна чоколаде. Исто тако, циљ ове докторске дисертације био је испитивање

способности колонизације пробиотских бактерија у органима за варење, као и испитивање утицаја пробиотских бактерија на микрофлору фецеса волонтера.

У поглављу **Материјал и методе**, кандидаткиња је описала велики број метода које је користила током израде тезе. Прво подпоглавље материјала и метода је започето са описом методе изолације аутохтоних бактерија млечне киселине и методе које су коришћене за њихову карактеризацију и селекцију. Након карактеризације изолата, кандидаткиња наводи методе које је користила за идентификацију селекованих изолата, односно API систем и молекуларне методе.

Након тога, кандидаткиња је описала *in vitro* методе које су коришћене за испитивање пробиотских карактеристика (способност преживљавања симулираних гастроинтестиналних услова, резистенција на антибиотике и одређивање минималне инхибиторне концентрације антибиотика, антимикробна активност) селекованих аутохтоних бактерија млечне киселине.

Кандидаткиња износи методологију која је коришћена за инкапсулацију техником спреј сушења селекованих потенцијални пробиотских бактерија, као и методе одређивања вијабилности спреј сушених потенцијалних пробиотских ћелија (метода разређења и real time PCR).

Након спреј сушења потенцијалних пробиотских бактерија, у наредном подпоглављу је описана производња јогурта, сира од УФ млека и црне чоколаде са пробиотским бактеријама, где су пробиотске бактерије примењене као слободне и спреј сушене ћелије. Такође, након примене пробиотских бактерија, описане су методе утврђивања вијабилности стартер култура, које су коришћене у производњи јогурта и сира од УФ млека, као и одређивање броја пробиотских бактерија током складиштења. Такође, описане су и методе сензорне анализе прехранбених производа са пробиотским бактеријама, где је испитиван утицај додатих пробиотских бактерија на сензорни квалитет производа.

У наредном поглављу описана је методологија *in vivo* студије у којој су учествовале групе од по 10 волонтера који су током 14 дана конзумирали производе са пробиотским бактеријама (прах спреј сушених пробиотица, јогурт, сир од УФ млека и црна чоколада са спреј сушеним пробиотицима). У оквиру овог дела, вршено је испитивање микрофлоре фецеса волонтера пре и након конзумирања производа са пробиотицима, а након конзумирања вршила се и изолација лактобацила, како би се установило присуство пробиотских бактерија у фецесу волонтера. На тај начин, утврђивала се способност преживљавања гастроинтестиналних услова селекованих аутохтоних спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија. У наставку подпоглавља описане су методе изолације ДНК изолованих лактобацила из фецеса, као и метода утврђивања присуства пробиотских бактерија помоћу молекуларне методе RAPD-PCR. Последњи део поглавља представља статистичку анализу података (STATISTICA 6.0 и ANOVA анализа).

У поглављу **Резултати и дискусија**, кроз 10 подпоглавља представљени су и интерпретирани резултати истраживања, уз упоређивање са резултатима других аутора. Дискусија је поткрепљена са литературним наводима који указују на сличне или исте резултате. У подпоглављу Изолација бактерија млечне киселине, кандидаткиња наводи да је изоловано укупно 61 изолат бактерија млечне киселине из пиротског качкаваља и сјеничког сира, од чега је изоловано 21 термофилних и 40 мезофилних изолата. Након изолације, у подпоглављу Морфолошке карактеристике, представљени су резултати испитивања каталаза теста, ферментације шећера, способности раста при различитим температурама и различитим концентрацијама соли, способност продукције егзополисахарида, способност раста на различитим рН вредностима, ацидогена способност, способност продукције аромогених једињења и протеолитичка способност

изолата из традиционалних сирева, при чему је на основу добијених резултата за даља испитивања селектовано 9 изолата. Из Пиротског качкаваља је изоловано укупно 5 изолата, док су 4 изолата из Сјеничког сира, који су изоловани и окарактерисани у ранијим испитивањима.

У следећем подпоглављу, Идентификација изолата, дати су резултати идентификације селектованих изолата помоћу API система и PCR методе са специфичним прајмерима. Помоћу молекуларних метода 5 изолата је идентификовано као *Lactobacillus plantarum*, а 4 изолата су идентификована као *Lactobacillus paracasei*. Помоћу API система су добије различити резултати, што је и очекивано, с обзиром на то да је API систем непоуздан метод идентификације бактерија млечне киселине.

Након идентификације, представљени су резултати испитивања пробиотских карактеристика селектованих лактобацила који су приказани у подпоглављу Пробиотске карактеристике селектованих изолата. Приказани су резултати испитивања преживљавања симулираних гастроинтестиналних услова, при чему добијени резултати указују на веома добру способност преживљавања ниских pH вредности и присуство пепсина, као и присуство панкреатина и жучних соли. Такође, дати су резултати резистенције на антибиотике где резултати добијени дифузном методом показују да је већина лактобацила природно резистентна на поједине антибиотике, као и да је осетљива на дејство појединих антибиотика. Једино је лактобацил *Lb. plantarum* Z9 показао резистенцију на антибиотик тетрациклин, због чега је искључен из даљих испитивања. Такође, представљени су резултати испитивања минималне инхибиторне концентрације антибиотика селектованих лактобацила, где је установљено да су лактобацили природно резистентни на ванкомицин, стрептомицин и гентамицин, што је у складу са истраживањима других аутора. Међутим, кандидаткиња наводи да постоји могућност да селектовани лактобацили поседују стечену резистенцију на канамицин с обзиром на то да су резистентни на већим концентрацијама (364 µg/ml) у односу на прописане вредности према EFSA смерницама (64 µg/ml) за процену антибиотске осетљивости. Исто тако, сојеви *Lb. plantarum* Z5, *Lb. paracasei* Z8, *Lb. plantarum* K621 и *Lb. plantarum* 564 могу поседовати стечену резистенцију на гентамицин. Приликом испитивања антимикробне активности селектованих лактобацила на патогене микроорганизме установљено је да селектовани лактобацили поседују антимикробну активност са зонама инхибиције које су се кретале у границама од 11-23 mm.

Након испитивања пробиотских карактеристика селектованих лактобацила, на основу добијених резултата, за даља испитивања одабрана су два соја *Lb. paracasei* Z8 и *Lb. plantarum* 564.

У поглављу Микроинкапсулација потенцијалних пробиотских бактерија спреј сушењем, прво су приказани резултати испитивања резистентности потенцијалних пробиотских бактерија на повишене температуре. Добијени резултати указују на то да су обе потенцијално пробиотске бактерије показале добру резистенцију на повишене температуре (Д вредност *Lb. paracasei* Z8 била је 1,86 минута на температури од 59°C и 0,82 мин на 61°C, а Д вредност *Lb. plantarum* 564 је била 1,74 минута на 59°C и 0,8 мин на 61°C). Након завршеног процеса спреј сушења представљени су резултати испитивања вијабилности спреј сушених потенцијалних пробиотских ћелија, где добијени резултати указују да су током процеса спреј сушења постигнути оптимални услови, с обзиром на то да су потенцијалне пробиотске ћелије преживеле у високом броју. Број спреј сушених ћелија потенцијалних пробиотских бактерија, одређених методом разређења је 9,45 log cfug⁻¹ за *Lb. plantarum* 564, а 10,52 log cfug⁻¹ за *Lb. paracasei* Z8, док је број спреј сушених ћелија одређених real time PCR методом са ПМА био 9,2 log cfug⁻¹ за *Lb. plantarum* 564 и 10,35 log cfug⁻¹ за *Lb. paracasei* Z8.

Такође, нису установљене статистички значајне разлике у броју спреј сушених потенцијалних пробиотских ћелија између методе разређења и real time PCR методе. Такође, спреј сушене потенцијалне пробиотске бактерије су имале веома добру вијабилност након 60 минута инкубације у симулираним желудачним условима, док је након симулирања интестиналних услова дошло до значајног пада броја ћелија (2,53 лог једница код *Lb. plantarum* 564 и 3,54 лог једница код *Lb. paracasei* Z8). Приказани резултати указују да процес микроинкапсулације техником спреј сушења није представљао значајну заштиту пробиотским бактеријама током пролаза кроз симулиране интестиналне услове. С друге стране, спреј сушење је обезбедило веома добру заштиту потенцијалним пробиотским бактеријама током пролаза кроз желудачне услове.

У наредном поглављу, Примена пробиотских бактерија у производњи јогурта, сира од ултрафилтрираног (УФ) млека и црне чоколаде, потенцијална пробиотска бактерија *Lb. plantarum* 564 селектована је на основу претходно добијених резултата (слободне ћелије $9,44 \log \text{cfug}^{-1}$ и спреј сушене ћелије $9,45 \log \text{cfug}^{-1}$) за примену у наведеним производима. Као контролни пробиотик коришћен је *Lb. plantarum* 299v (DSM 9843). У првом делу наведеног подпоглавља приказан је број слободних и спреј сушених ћелија пробиотика *Lb. plantarum* 299v, где је број слободних ћелија био $9,72 \log \text{cfug}^{-1}$, а спреј сушених ћелија $9,84 \log \text{cfug}^{-1}$.

У наредном подпоглављу приказани су резултати испитивања рН вредности јогурта и сирева од УФ млека са додатим пробиотским бактеријама. Приказани резултати указују да су се рН вредности експерименталних варијанти јогурта кретале у очекиваним границама, када је у питању производња и складиштење јогурта. Према Правилнику о квалитету млека и стартер култура (2014), рН вредности јогурта у року трајања не сме да буде мања од 3,8, што указује да су вредности свих варијанти јогурта са пробиотицима биле на задовољавајућем нивоу. Код контролне варијанте (КЈ), као и код експерименталних варијанти јогурта, није установљена статистички значајна разлика у рН вредностима током периода складиштења. Код сирева од УФ млека са пробиотским бактеријама, након производње рН вредност сирева се крела у границама од 4,7-4,8, док се на крају складиштења рН вредност крела у границама од 4,21-4,4. Између контролне варијанте сира од УФ млека и варијанти са пробиотским бактеријама нису постојале статистички значајне разлике.

У подпоглављу, Вијабилност стартер култура и пробиотских бактерија у прехранбеним производима са пробиотским бактеријама, прво су представљени резултати испитивања броја стартер култура у јогурту и сиру од УФ млека. У свим варијантама јогурта, стрептококе су се одржале на нивоу већем од 10^8cfuml^{-1} током целокупног периода складиштења. Код појединих варијанти јогурта дошло је до пада броја ћелија лактобацила, да би на крају складиштења броја лактобацила био на нивоу већем од 10^7cfuml^{-1} . Између варијанти није било статистички значајних разлика ($p \geq 0,05$) у броју стартер култура. Исто тако, између понављања нису установљене статистички значајне разлике ($p \geq 0,05$).

Почетни број стартер култура у сиру од УФ млека је био на високом нивоу (изнад 10^9cfug^{-1}) у свим варијантама и тај број се одржао током 14 дана. Након 21 дана складиштења, дошло је до пада броја стартер култура у свим варијантама сирева, при чему се број ћелија одржао на нивоу изнад 10^8cfug^{-1} . Овај висок ниво стартер култура се одржао до краја 56 дана складиштења. Између контролне варијанте и варијанти сирева са пробиотским бактеријама није било значајних разлика у броју стартер култура ($p \geq 0,05$).

Током складиштења јогурта примећено је да је број слободних и спреј сушених ћелија пробиотских бактерија био веома сличан, али тренд промене броја током складиштења

је био различит, због чега је на крају складиштења дошло до разлике у броју. Инкапсулација спреј сушењем допринела је постепеном отпуштању имобилисаних ћелија, због чега није дошло до варирања броја ћелија током складиштења јогурта. Број инкапсулисаних ћелија *Lb. plantarum* 564 ($9,8 \times 10^7$ cfu ml⁻¹) је био незнатно већи него број слободних ћелија у јогурту ($4,3 \times 10^7$ cfu ml⁻¹) након 21 дана складиштења. Иста ситуација је примећена и код *Lb. plantarum* 299v (инкапсулисане $4,014 \times 10^8$ cfu ml⁻¹ и слободне ћелије $2,7 \times 10^8$ cfu ml⁻¹), што би могло да укаже на бољу вијабилност спреј сушених ћелија у односу на слободне пробиотске ћелије у јогурту. Међутим, разлике у броју ћелија нису статистички значајне.

Током 56 дана складиштења сира од УФ млека, број слободних и инкапсулисаних пробиотика се одржао на нивоу већем од 10^8 cfu g⁻¹. Нису запажене значајне статистичке разлике ($p \geq 0,05$) између варијанти сирева од УФ млека са слободним и спреј сушеним пробиотским ћелијама. Због већег процента масти и бољег пуферног капацитета, сир од УФ млека је представљао погоднију средину за раст пробиотских бактерија у односу на јогурт. Захваљујући карактеристикама сира од УФ млека, вијабилност слободних и спреј сушених пробиотика била је на вишем нивоу (већем од 1 логаритамске јединице) и током значајно дужег временског периода (током 56 дана) у односу на јогурт са пробиотским бактеријама.

Током складиштења црне чоколаде резултати вијабилности показују да су оба пробиотика била на нивоу потребном за терапеутски ефекат, све до 90 дана. Међутим, број пробиотских ћелија се одржао на нивоу 10^6 cfu g⁻¹ током 270 дана складиштења, што указује да се конзумирањем нешто веће количине црне чоколаде (око 50 g) може унети потребан дневни унос пробиотика. Нису установљене статистички значајне разлике између понављања ($p \geq 0,05$). Такође, указано је да су пробиотици остварили одговарајућу вијабилност (већу од 10^6 cfu g⁻¹) током складиштења на температури од 20°C, чиме црна чоколада остварује своју функционалност и током складиштења на собној температури.

У наредном поглављу, Сензорна оцена производа са пробиотским бактеријама, приказани су резултати сензорног оцењивања јогурта, сира од УФ млека и црне чоколаде са пробиотским бактеријама. Све варијанте јогурта и њихови сензорни параметри су оцењени високим оценама и могу се описати као производи с прихватљивим сензорним карактеристикама. Код јогурта са слободним ћелијама потенцијалног пробиотика *Lb. plantarum* 564, примећено је да се проценат од максималног квалитета кретао у границама од 80,50-99,71%, док се код јогурта са спреј сушеним ћелијама *Lb. plantarum* 564 кретао у границама од 80,92-91,00%. Јогурт са слободним ћелијама *Lb. plantarum* 299v имао је нешто ниже оцене за укус услед појеве киселог и опорог укуса. Међутим, и поред некарактеристичног укуса, овај јогурт је остварио прихватљив сензорни квалитет са процентом од максималног квалитета у границама од 82,42-87,57%. Код јогурта са спреј сушеним ћелијама *Lb. plantarum* 299v такође је примећен непријатно кисео и опор укус, при чему се проценат од максималног квалитета овог јогурта кретао у границама од 74,64-86,57%.

Сиреви са слободним и инкапсулисаним ћелијама пробиотских бактерија добили су високе оцене за све параметре сензорног квалитета током складиштења (у границама од 2,83-5,00). Иако су постојале поједине разлике у сензорном квалитету, све варијанте сирева од УФ млека се могу окарактерисати као производи с прихватљивим сензорним карактеристикама. Сир са слободним ћелијама потенцијалног пробиотика *Lb. plantarum* 564 је имао висок проценат од максималног квалитета који се кретао у границама од 92,30-99,30%, а сир са спреј сушеном потенцијалном пробиотском бактеријом *Lb. plantarum* 564 био је одличног сензорног квалитета до 35. дана складиштења и кретао се у границама од 98,5-96,85% од максималног квалитета. Међутим, након 35 дана

складиштења долази до пада сензорног квалитета услед појаве некарактеристичног укуса и мириса сира. Сир са слободним ћелијама комерцијалног пробиотика *Lb. plantarum* 299v је имао прихватљив сензорни квалитет са процентом од максималног квалитета од 80,81-92,81%, док је сир са спреј сушеним *Lb. plantarum* 299v био слично оцењен са процентом од максималног квалитета од 80,52-95,50%, при чему је примећена појава киселог и опорог укуса.

За најбитније параметре сензорног оцењивања, укуса и мириса, црна чоколада са спреј сушеним потенцијалним пробиотиком *Lb. plantarum* 564 добила је веома високе оцене (4,5-5,0), при чему је проценат од максималног квалитета био 89,66% након 60 дана и 95,25% након 180 дана складиштења. Самим тим, може се установити да потенцијални пробиотик није довео до појаве страних укуса и мириса. Црна чоколада са спреј сушеним пробиотиком *Lb. plantarum* 299v након 60 дана складиштења је остварила проценат од максималног квалитета 89,06%, при чему није дошло до појаве страног укуса и мириса, док је проценат од максималног квалитета након 180 дана складиштења био 95,25%. Такође, нису примећене статистичке значајне разлике ($p \geq 0,05$) у оценама сензорног квалитета црне чоколаде са пробиотским бактеријама у односу на контролну варијанту.

Након производње прехранбених производа са пробиотским бактеријама, спроведена је *in vivo* студија у циљу испитивања способности преживљавања пробиотских бактерија у гастроинтестиналним условима, при чему су у првом делу поглавља Способност преживљавања у гастроинтестиналним условима-*in vivo* студија, приказани резултати испитивања микрофлоре фецеса волонтера. Након конзумирања сваког производа са спреј сушеним *Lb. plantarum* 564 и *Lb. plantarum* 299v дошло је до смањења броја ентеробактерија, ентерокока и сулфиторедукујућих клостридија (у границама од 0,5-1,8 логаритамских јединица). Поред тога, конзумирање производа са наведеним пробиотским бактеријама довело је и до тренда повећања укупног броја лактобацила (у границама од 0,5-1 логаритамских јединица).

Такође, представљена је и упоредна анализа просечних логаритамских вредности појединих група микроорганизама сваке групе волонтера пре и након конзумирања производа са спреј сушеним пробиотским бактеријама која је имала за циљ да установи смањење или повећање одређених група микроорганизама. Након конзумирања праха и јогурта са спреј сушеним ћелијама *Lb. plantarum* 299v дошло је до тренда повећања броја аеробних мезофилних бактерија (0,1 лог јединица код праха и 0,2 лог јединица код јогурта), за разлику од сира од УФ млека (0,3 лог јединица) и црне чоколаде (0,5 лог јединица) са *Lb. plantarum* 299v и свих производа са *Lb. plantarum* 564 где је примећен тренд пада броја ћелија аеробних мезофилних бактерија (у границама од 0,1-0,6 лог јединица). Број анаеробних мезофилних бактерија био је најнижи након конзумирања обе варијанте јогурта, где је детектовано смањење броја за 0,9 лог јединица код јогурта са *Lb. plantarum* 299v и 0,5 лог јединица код јогурта са *Lb. plantarum* 564, док је највећи број анаеробних мезофилних бактерија детектован код црне чоколаде са *Lb. plantarum* 564 ($9,5 \log \text{ cfug}^{-1}$). Након конзумирања праха спреј сушеног пробиотика *Lb. plantarum* 299v дошло је до тренда редукције броја ентеробактерија за 1 логаритамску јединицу, док је након конзумирања осталих производа дошло до мањег тренда смањења броја ентеробактерија (у границама до 0,5-0,8 лог јединица). Такође, након конзумирања производа са спреј сушеним *Lb. plantarum* 564 дошло је до тренда пада броја ентеробактерија (у границама од 0,8-0,9 лог јединица), при чему је највећи пад броја ћелија примећен након конзумирања јогурта и сира од УФ млека са *Lb. plantarum* 564 (0,9 лог јединица). Након конзумирања свих производа са наведеним пробиотицима дошло је до тренда смањења броја ентерокока (у границама од 0,5-1 лог јединица), при чему је највећи пад броја

ентерокока примећен код праха спреј сушених ћелија *Lb. plantarum* 299v (1 лог јединица). Највећи тренд пада броја сулфиторедукујућих клостридија је утврђен након конзумирања јогурта са спреј сушеним *Lb. plantarum* 299v (1,8 лог јединица), а након конзумирања сира од УФ млека са *Lb. plantarum* 564 дошло је до пада броја ћелија сулфиторедукујућих клостридија за 1.4 логаритамских јединица. Приликом конзумирања производа са *Lb. plantarum* 564 примећен је пораст броја лактобацила који се кретао у границама од 0,5-0,7 логаритамских јединица, док је након конзумирања производа са *Lb. plantarum* 299v примећен пораст броја лактобацила који се кретао у границама од 0,6-1 логаритамских јединица.

У наставку подпоглавља, приказани су и резултати процентуалног удела лактобацила, сулфиторедукујућих клостридија, ентеробактерија и ентерокока у фецесу волонтера пре и након конзумирања производа са пробиотским бактеријама, где је установљено да је након конзумирања већине производа са пробиотским бактеријама дошло до смањења процентуалног удела непожељних микроорганизама који се кретао у границама од 1-3%, а у појединим случајевима и до непромењеног удела. Самим тим, код већине производа са пробиотиком дошло је до повећања удела лактобацила (од 1-5%).

Након конзумирања производа са спреј сушеним потенцијалним пробиотиком *Lb. plantarum* 564 и комерцијалним пробиотиком *Lb. plantarum* 299v, изоловано је 800 лактобацила из различитих група волонтера, при чему је након бојења по Граму и микроскопирања, за даља испитивања одабрано 717 изолата. Након анализе помоћу молекуларне методе RAPD-PCR, установљено је да потенцијални пробиотик *Lb. plantarum* 564 преживљава неповољне услове ГИ тракта. Такође, резултати испитивања су указали да је потенцијални пробиотик *Lb. plantarum* 564 преживео код највећег број волонтера након конзумирања црне чоколаде са наведеним пробиотиком (код 7 од 10 волонтера у групи), док је код нешто мањег броја преживео након конзумирања сира од УФ млека и јогурта са наведеним пробиотиком (код 4 од 10 волонтера). Након конзумирања праха спреј сушеног потенцијалног пробиотика *Lb. plantarum* 564, наведени пробиотик је изолован код најмањег броја волонтера (код 3 од 10 волонтера). Слични резултату су добијени и након испитивања способности преживљавања пробиотика *Lb. plantarum* 299v у ГИ условима, где је наведени пробиотик изолован у највећем броју фецеса волонтера након конзумирања црне чоколаде и сира од УФ млека (код 8 од 10 волонтера). У мањем броју је изолован из фецеса волонтера након конзумирања јогурта са наведеним пробиотиком (код 4 од 10 волонтера), док је у најмањем броју изолован из фецеса волонтера након конзумирања праха спреј сушеног пробиотика (код 2 од 10 волонтера).

Резултати докторске дисертације, као и других истраживања, јасно указују на значајну улогу црне чоколаде као носача пробиотских бактерија. Такође, сир од УФ млека и јогурт су показали да је унос пробиотика кроз прехранбене производе ефективнији у односу на прах спреј сушених пробиотских ћелија, односно фармацеутски препарат.

У поглављу **Закључак**, на основу анализе добијених резултата кандидаткиња је извела закључке на основу којих је утврђено да су остварени циљеви докторске дисертације. Кандидаткиња је закључила да су из традиционалних сирева, Пиротског качкаваља и Сјеничког сира, изоловани 61 изолата бактерија млечне киселине од којих је након испитивања морфолошких и технолошких особина за даља испитивања селектовано 9 изолата. Изолати из Пиротског качкаваља су идентификовани као *Lb. plantarum* K16, K50 и *Lb. paracasei* K27, K71, K621, док су изолати из Сјеничког сира идентификовани као *Lb. plantarum* 564, Z5 и Z9, а Z8 као *Lb. paracasei*. Испитивањем способности преживљавања симулираних гастроинтестиналних услова, селектовани лактобацили су показали добру способност преживљавања, док је приликом испитивања антибиотске

резистенције установљено да је већина лактобацила природно резистентна на поједине антибиотике. Такође, кандидаткиња је закључила да селектовани лактобацили врше инхибицију патогених микроорганизама у одређеном степену.

Испитивањем вијабилности и пробиотских карактеристика спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија *Lb. plantarum* 564 и *Lb. paracasei* Z8, показано је да проботици добро преживљавају повишене температуре. Такође, након спреј сушења 93% ћелија *Lb. plantarum* 564, као и 95,3% ћелија *Lb. paracasei* Z8 је преживело процес спреј сушења. Исто тако, изведен је закључак да није постојала значајна статистичка разлика у броју живих ћелија између методе разређења и real time PCR методе са ПМА. Самим тим, може се закључити да су током процеса спреј сушења остварени оптимални услови. Поред наведеног, спреј сушене потенцијалне пробиотске бактерије су показале добру способност преживљавања симулираних желудачних услова, али процес спреј сушења није пружио значајну заштитну улогу пробиотицима у присуству жучних соли и панкреатина, где је дошло до значајног пада броја ћелија (2,53 лог јединица код *Lb. plantarum* 564 и 3,54 лог јединица код *Lb. paracasei* Z8).

Након примене пробиотских бактерија *Lb. plantarum* 564 и *Lb. plantarum* 299v у производњи јогурта и сира од УФ млека, наводи се закључак да су промене рН вредности свих варијанти јогурта биле у очекиваним границама (4,4-4,6), док је рН вредност сирева од УФ млека била у границама одговарајућим за ову врсту сирева (4,21-4,8). Такође, број ћелија јогуртних стартер култура су биле на нивоу већем од 10^7 cfu ml^{-1} током складиштења, а стартер културе у сиру од УФ млека са пробиотским бактеријама су биле на нивоу већем од 10^8 cfu g^{-1} .

Испитивањем вијабилности слободних и спреј сушених пробиотских ћелија у јогурту са пробиотским бактерија, установљено је да је број ћелија био на задовољавајућем нивоу (већем од 10^7 cfu g^{-1}), док је код сирева од УФ млека са пробиотицима број ћелија био на нивоу већем од 10^8 cfu g^{-1} током складиштења. Исто тако, примећен је незнатно већи број спреј сушених ћелија код јогурта са пробиотицима као и код сира од УФ млека, али разлике у броју нису биле статистички значајне. Такође, изведен је закључак да су пробиотици опстали на потребном нивоу за терапеутски ефекат током 9 месеци складиштења црне чоколаде (већем од 10^6 cfu g^{-1}).

Сензорном анализом јогурта, сира од УФ млека и црне чоколаде са пробиотским бактеријама слободне и спреј сушене ћелије потенцијалног пробиотика *Lb. plantarum* 564 нису довеле до значајних сензорних промена јогурта и сира од УФ млека, као ни спреј сушене пробиотске ћелије на сензорни квалитет црне чоколаде. Поред тога, јогурт и сир од УФ млека са слободним и спреј сушеним ћелијама *Lb. plantarum* 299v су поседовали изражен кисели укус, због чега су наведени производи оцењени нешто нижим оценама, при чему припадају категорији прихватљивог сензорног квалитета (процент од максималног квалитета код јогурта се кретао у границама 74,64-86,57%, а код сира од УФ млека био је 80,52-96,9%). Црна чоколада са спреј сушеним комерцијалним пробиотиком *Lb. plantarum* 299v је оцењена одличним сензорним квалитетом (89,06-95,25%).

Микробиолошком анализом фецеса волонтера који су конзумирали производе прах, јогурт, сир од УФ млека и црну чоколаду са спреј сушеним пробиотицима *Lb. plantarum* 564 и *Lb. plantarum* 299v, закључено је да долази до тренда смањења броја сулфиторедукујућих кластридија, ентеробактерија и ентерокока (у границама од 0,5-1,8 лог јединица). Такође, обе пробиотске бактерије су довеле до тренда повећања броја лактобацила у фецесу (0,5-1 лог јединица). Поређењем процентуалног удела лактобацила, сулфиторедукујућих кластридија, ентерокока и ентеробактерија, закључено је да конзумирање производа са пробиотицима доводи до смањења удела

непожељних микроорганизама (1-3%), као и до повећања процентуалног удела лактобацила (1-5%).

Испитивањем способности преживљавања потенцијалне пробиотске бактерије *Lb. plantarum* 564 гастроинтестиналних услова у *in vivo* студији, изведен је закључак да наведени пробиотик преживљава неповољне услове ГИ тракта. Такође, испитивањем присуства *Lb. plantarum* 564 у фецесу волонтера, најбољу способност преживљавања гастроинтестиналних услова наведеи пробиотик показао је након конзумирања црне чоколаде, док је пробиотик *Lb. plantarum* 299v најбоље преживео код волонтера који су конзумирали сир од УФ млека и црну чоколаду. Добијени резултати указују на значајно бољу улогу прехранбених производа као носача пробиотских бактерија, у поређењу са фармацеутским препаратом.

У поглављу **Литература** наведен је списак од 313 референци. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива сва поља истраживања и разматрана питања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Милице Мирковић, дипл. инж. под насловом ”Примена и вијабилност аутохтоних спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине у храни и гастроинтестиналним условима” представља оригиналан и самосталан научни рад од великог научног и практичног значаја. Дисертација је резултат успешно спроведеног научног рада кандидаткиње, која је у сагласности са планом истраживања прихваћеним приликом пријаве дисертације.

Кандидаткиња је успешно применила савремене методе, при чему су добијени поуздани резултати. Обрада, приказ и разматрање добијених резултата су коректно урађени и поређени са резултатима других аутора. Сlike, графикони и табеле у дисертацији су прегледно приказани, а текст је јасан и читак.

Одабрана тема истраживања је од великог значаја за откривање великог потенцијала аутохтоних бактерија млечне киселине изолованих из традиционалних сирева, које представљају неисцрпан извор за примену у различитим гранама биотехнологије. Дисертације је пружила и допринос приликом испитивања утицаја спреј сушења на вијабилност и карактеристике пробиотских бактерија, као и на доказивање заштитне улоге процеса спреј сушења. Такође, резултати докторске дисертације су показали да пробиотске бактерије могу бити примењене у производњи јогурта и сира од УФ млека, али исто тако и у производњи кондиторског производа, црне чоколаде. Такође, докторска дисертација има посебан значај, где је указано да црна чоколада има велики потенцијал за примену спреј сушених пробиотских бактерија, с обзиром да је наведени производ пружио веома добру заштиту пробиотским бактеријама, како током скалдиштења производа, тако и током пролаза кроз гастроинтестинални тракт.

На основу свега изнетог у овом извештају, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Милице Мирковић, дипл. инж. под насловом ”Примена и вијабилност аутохтоних спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине у храни и гастроинтестиналним условима” и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

Чланови Комисије:

др Зорица Радуловић, ванредни професор (Технолошка
микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Виктор Недовић, редовни професор (Биохемија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Бојана Богович Матијашић, научни саветник
(Млекарство)
Универзитет у Љубљани, Биотехнички факултет

др Јелена Миочиновић, ванредни професор (Наука о млеку)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Марица Ракин, ванредни професор (Биохемијско
инжењерство и биотехнологија)
Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у
Београду

Радови објављени у научним часописима са SCI листе који су проистекли из докторске дисертације Милице Мирковић, под насловом ”Примена и вијабилност аутохтоних спреј сушених потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине у храни и гастроинтестиналним условима”.

Radulović, Z., Mirković, N., Bogović-Matiјаšić, B., **Petrušić, M.**, Petrović, T., Nedović, V. (2012): Quantification of viable spray-dried potential probiotic lactobacilli using real-time PCR. Archive of Biological science 64(4), 1465-1472.