

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:

1. Датум и назив органа који је именовао комисију: 23.12.2015., 162. седница Наставно-научног већа Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду

2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:

1. др Милан Ж. Балтић, редовни професор у пензији, Хигијена и технологија меса, 1996. год. Факултет ветеринарске медицине, Београд

2. др Владо Теодоровић, редовни професор, Хигијена и технологија меса, 2008. год. Факултет ветеринарске медицине, Београд

3. др Драган Василев, доцент, Хигијена и технологија меса, 2014. год. Факултет ветеринарске медицине, Београд

4. др Јелена Ивановић, научни сарадник, Хигијена и технологија меса, 2015. год. Факултет ветеринарске медицине, Београд

5. др Весна Ђорђевић, научни сарадник, Хигијена и технологија меса, 2010. год., Институт за хигијену и технологију меса, Београд

II 1. Име, име једног родитеља, презиме: Радмила, Радомир, Митровић

2. Датум рођења, општина, Република: 26.12.1969. год., Ћуприја, Ћуприја, Србија

3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе: 12.05.2014, Нови Сад, Утицај исхране на квалитет меса матица калифорнијске пастрмке (*Oncorhynchus mykiss*)

4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: Хигијена и технологија меса

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: „Испитивање могућности инактивације *Yersinia enterocolitica* у ферментисаним кобасицама“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ :

Докторска дисертација Радмиле Митровић написана је на 156 страна текста и садржи следећа поглавља: Увод (две стране), Преглед литературе (35 страна), Циљеви и задаци истраживања (једна страна), Материјал и методе истраживања (5 страна), Резултати истраживања (30 страна), Дискусија (25 страна), Закључци (једна страна), Прилог (28 страна) и Списак литературе (20 страна, 184 референце). На почетку дисертације дат је кратак садржај на српском и енглеском језику. Дисертација је документована са 103 табеле (од којих се 77 табела налази у Прилогу) и 27 графикона.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ :

У Уводу кандидат истиче да су ферментисане кобасице уствари сирове кобасице, које се припремају од уситњеног меса, чврстог масног ткива, нитритне соли, шећера и зачина. Спонтана ферментација код ове врсте кобасица условљена је присуством у надеву кобасица (сировине) бактерија млечне киселине и коагулаза негативних кока (*Staphylococcus spp.*, *Kocuria spp.*). Ферментација се успешније контролише употребом starter култура. Као starter културе најчешће се користе *Lactobacillus sakei*, *L. curvatis*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *Pediococcus pentosaceus* и *Pediococcus acidilactici*. После пуњења у омотаче кобасице се подвргавају зрењу у току кога долази до микробиолошких, физичких, хемијских и ензимских промена које осигуравају одрживост готовог производа, као и карактеристичне сензорне особине. Конзервишући ефекат код

ових кобасица постиже се пре свега сушењем (зрењем), а и поступком хладног димљења. У већини земаља у свету па и у Србији, преовладава производња ферментисаних кобасица које се према конзистенцији сврставају у кобасице за резање. Готови производи садрже мање од 35% воде. Основни принципи израде ових кобасица су универзални. Најчешће се ферментисане кобасице производе од чистог свињског меса и чврстог масног ткива. Ретко се додаје говеђе месо, и ако се додаје та количина обично не прелази више од 10%. Избору свиња се не придаје посебан значај, али је квалитет готовог производа бољи ако се свиње кољу при маси од око 150 kg или већој. То осигурава употребу меса зрелих животиња у производњи ферментисаних кобасица које има своје предности у њиховој производњи. Обрада меса и масног ткива, односно уситњавање масе, обавља се у уређајима за уситњавање меса (кутер, машина за млевење) при чему уситњеност најева може да варира у зависности од врсте производа. Обично се наев намењен за производњу кобасица ширег дијаметра мање уситњава, а наев за кобасице ужег дијаметра се припрема од меса које је ситније самлевено. Код кобасица ширег дијаметра израженији су ферментативни процеси док код кобасица ужег дијаметра преовладавају физички процеси, односно сушење производа. Ово има за последицу и разлике у микрофлори, физичким и хемијским променама које се одвијају у току зрења, а које утичу и на квалитет готовог производа. Производе се у индустријским и занатским објектима, а такође и у домаћинствима. Разумљиво је да са обзиром на место производње, услови производње нарочито они који се односе на процесе зрења, могу бити контролисани (климатизоване коморе), односно могу да се прате температурни услови у току зрења, циркулација и влажност ваздуха као и време и температура димљења. Контролисани услови производње везују се за индустријске објекте и један део занатских објеката. Данас се у индустријским условима сушење и зрење одвија у вештачким климатизованим просторијама, коморама, тако да се производња може одвијати у свим деловима света. Ферментација сирових кобасица има за циљ добијање безбедних производа, односно производа који не садрже патогене узрочнике болести преносиве храном међу којима је и *Yersinia enterocolitica*. Код ферментисаних кобасица које се производе без термичког третмана у току зрења и сушења користе се услови који заустављају раст патогених бактерија захваљујући истовременом деловању више фактора као што су смањење a_w вредности, рН вредности, присуство млечне киселине, инхибиторно дејство компоненти дима (ако се кобасице диме), присуство стартер култура и деловање њихових метаболита (бактериоцина) итд. Инактивација патогених бактерија у току зрења кобасица подразумева контролу њиховог раста и представља кључни корак у производњи ферментисаних кобасица. Редукција њиховог броја престаје или је недовољна ако поступак зрења не траје довољно дуго или није оптималан (температура, влажност, циркулација ваздуха) због чега овај процес треба да буде контролисан.

Поглавље **Преглед литературе** написано је на основу библиографских података (185 референци) и подељено у десет основних подпоглавља (Значај меса у исхрани људи, Производи од меса, Ферментисане кобасице, Сировина и избор сировине, Додати састојци, Омотачи, Стартер културе, Патогени микроорганизми, Производни процес, Квалитет и безбедност готових производа).

Циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације био је да се у контролисаним условима производње прате промене броја бактерије *Yersinia enterocolitica* у ферментисаним кобасицама ужег и ширег дијаметра са и без додатка стартер култура. Поред промене броја бактерија *Yersinia enterocolitica* праћен је и број аеробних мезофилних бактерија, промене броја бактерија млечне киселине као и промене броја ентеробактерија. Истовремено са праћењем микробиолошких чинилаца праћени су и чиниоци који утичу на инактивацију овог патогена (a_w вредност и рН вредност). За остварење овог циља постављени су следећи **Задаци**:

1. У току осамнаест дана сушења/ зрења за кобасице ужег дијаметра, односно тридесет пет дана за кобасице ширег дијаметра од контролних и огледних узорак група су узети узорци за микробиолошка и хемијска испитивања, нултог, трећег, седмог, дванаестог, осамнаестог, двадесет петог и тридесет петог дана, ради праћења промена:

- броја *Yersinia enterocolitica*

- броја ентеробактерија,

- броја аеробних мезофилних бактерија,
- броја бактерија млечне киселине
- испитивање pH вредност
- испитивање a_w вредности

2. Испитивање основног хемијског састава надева, контролних група и огледних група кобасица урађено је нултог дана и на крају производног процеса.

У четвртном поглављу детаљно су описани **Материјал и методе истраживања**. За потребе експеримента је коришћено свињско месо прве и друге категорије (месо леђа, плећке, бута, месо са масним и везивним ткивом) као и одређени удео леђне сланине свиња. Месо је потицало од свиња раса јоркшир х ландрас, старости 12 месеци и просечне телесне масе око 180 кг. Припрема основне сировине за израду надева кобасица обухватала је сечење меса на комаде, одстрањивање меког масног ткива и грубљег везивног ткива. За уситњавање меса и масног ткива коришћен је кутер за уситњавање меса. Уситњавање је вршено до жељног степена уситњавања. Уситњено месо је остављено да се охлади на температури 0-5 °C. Након 24h, додата је зачинска смеша за чајну кобасицу (садржи глукозу, кухињску со, зачине и екстракте зачина) и нитритна со у количини од 2,3%. Након уситњавања, млевено месо је подељено у две групе (огледна и контролна). У надев огледне групе додата је припремљена култура референтног соја *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 ($8-9 \log^{10}$ CFU/ml). Поред *Yersinia enterocolitica*, за потребе овог експеримента у млевено месо је умешана и starter култура комерцијалног препарата Biostart Sprint "RAPS GMBH", (A-5162 Обертрум, Аустрија). Starter култура је садржала бактерија млечне киселине (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* и *Staphylococcus xylosus*). Starter култура је додата у количини од 20 g на 200 kg млевеног меса. Након мешања свих састојака, надев је одстојао четири сата у циљу бољег сједињавања свих компоненти. Затим је помоћу клипне пунице, надев пуњен у омотаче ужег (34mm) и ширег дијаметра (55mm). Прва група (KI) су биле кобасице ужег дијаметра контролне групе без starter културе, KII група су биле кобасице контролне групе кобасица ширег дијаметра без starter културе, KIII група су биле кобасице контролне групе ужег дијаметра са starter културом и KIV група су биле кобасице контролне групе ширег дијаметра са starter културом. Огледна група је такође била подељана у четири подгрупе (OI, OII, OIII и OIV). OI група је била огледна група кобасице ужег дијаметра без starter културе, OII група су биле кобасице огледне групе кобасица ширег дијаметра без starter културе, OIII група су биле кобасице огледне групе ужег дијаметра са starter културом и OIV група су биле кобасице контролне групе ширег дијаметра са starter културом. Кобасице су повезане канапом, обележене по групама и стављене на рамове у пушницу. Након цеђења, дванаест сати, кобасице су подвргнуте процесу димљења хладним поступком. Димљење је обављено у класичној пушници са отвореним ложиштем, три дана, са по шест сати на температури од 20-23 °C. Сушење и зрење кобасица је обављено у клима комори на температури од 17 °C и са релативном влажношћу ваздуха од 75%. Просец је трајао 18 дана за кобасице ужег дијаметра и 35 дана за кобасице ширег дијаметра.

У експерименталном делу ове докторске дисертације коришћене су:

- Микробиолошке анализе
- Хемијске и физичко-хемијске анализе

Микробиолошке методе су подразумевала испитивање:

1. Одређивање присуства *Yersinia enterocolitica* према ISO 10273:2003, Микробиологија хране и хране за животиње - Хоризонтална метода за откривање *Yersinia enterocolitica*.
2. Укупног броја аеробних мезофилних бактерија према ISO 4833: 2008, Микробиологија хране и хране за животиње - Хоризонтална метода за одређивање броја микроорганизама - Техника бројања колонија на 30° C;
3. Броја бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* према ISO 21528-2:2009, Микробиологија хране и хране за животиње - Хоризонтална метода за откривање и одређивање броја *Enterobacteriaceae* - Део 2: Метода бројања колонија;
4. Бактерија млечне киселине према методи ISO 15214:1998 (MPC, Merck);

За испитивање основног хемијског састава и физичко хемијских особина коришћене су следеће методе:

1. За одређивање садржаја воде - одређивање губитка масе при сушењу хомогенизованог узорка при 105 ± 1 °C до константне масе (SRPS ISO 1442:1997)
2. За одређивање садржаја масти - метода по Soxhletu, екстракцијом масти из осушеног узорка петрол етром, дестилацијом и сушењем при 105 ± 1 °C до константне масе (SRPS ISO 1443:1992)
3. За одређивање садржаја протеина - метода по Kjeldalh-у применом уређаја фирме "Tecator " (SRPS ISO 937:1992)
4. За одређивање пепела- сагоревање узорка при 550 °C до константне масе (SRPS ISO 936: 1999)
5. За одређивање натријум хлорида- метода по Волхарду SRPS ISO 1841-1 (1999)
6. За одређивање садржаја нитрита – по методи SRPS ISO 2918 (1999).
7. За одређивање вредности рН узорака ферментисаних кобасица коришћена је директна метода уводним рН- метром Тесто 150 (Тесто, Немачка), према упутству произвођача.
8. За одређивање a_w вредност према поступку Giménez и Dalgaard (2004)

Статистичка анализа

Као основне статистичке методе коришћени су дескриптивни статистички параметри. Дескриптивни статистички параметри, односно аритметичка средина, стандардна девијација, стандардна грешка, минимална, максимална вредност и коефицијент варијације, омогућавају описивање експерименталних резултата и њихово тумачење. За тестирање и утврђивање статистички значајних разлика између испитиваних група коришћена су два теста. За испитивање значајности разлика између средњих вредности две испитиване групе је коришћен t-тест. За испитивање значајности разлика између три и више посматраних третмана коришћен је групни тест, ANOVA, а затим је појединачним Tukey тестом испитивана статистичка значајност разлике између третмана. Сигнификантност разлика је утврђена на нивоима значајности од 5% и 1%. Сви добијени резултати су приказани табеларно и графички. Статистичка анализа добијених резултата је урађена у статистичком пакету PrismaPad 5.00.

Резултати испитивања (пето поглавље) приказани су, према задацима, у седам основних подпоглавља.

У првом подпоглављу резултата испитивања приказани су резултати укупног броја бактерија *Y. enterocolitica* узорака кобасица контролних и огледних група. У надеву контролне групе кобасица нултог дана испитивања није утврђено присуство *Y. enterocolitica*. На почетку испитивања, просечан број *Y. enterocolitica* у надеву огледних (контаминираних) група био је $6,17 \pm 0,04$ log CFU/ g.

У узорцима **кобасица ужег дијаметра**, односно ОI групе (група којој је додата starter култура), односно ОIII групе (група којој је додата starter култура) просечан број *Y. enterocolitica* трећег ($4,84 \pm 0,10$ log CFU/ g, $4,49 \pm 0,04$ log CFU/ g, појединачно) и седмог дана ($5,30 \pm 0,01$ log CFU/ g, $4,99 \pm 0,04$ log CFU/ g, појединачно) испитивања био је статистички значајно мањи ($p < 0,01$) од просечног броја бактерија у узорцима наведену нултог дана испитивања. Утврђене су такође, статистички значајне разлике између просечног броја *Y. enterocolitica* узорака кобасица ОI, односно ОIII групе између трећег и седмог дана испитивања. Трећег дана испитивања просечан број *Y. enterocolitica* ($4,84 \pm 0,10$ log CFU/ g) у узорцима кобасицама ужег дијаметра ОI групе био је статистички значајно већи од просечног броја *Y. enterocolitica* ($4,49 \pm 0,04$ log CFU/ g) у узорцима кобасица ОIII групе. Просечан број ($5,30 \pm 0,01$ log CFU/ g) *Y. enterocolitica* седмог дана испитивања у узорцима кобасицама ОI групе био је статистички значајно већи ($p < 0,01$) од просечног броја ($4,99 \pm 0,04$ log CFU/ g) *Y. enterocolitica* у узорцима кобасица ОIII групе. У кобасицама ужег дијаметра дванаестог, односно осамнаестог дана испитивања (крај производног процеса) није утврђено присуство *Y. enterocolitica* . Трећег дана зрења просечан број *Y. enterocolitica* у узорцима **кобасица ширег дијаметра** ОII групе, без starter културе се статистички значајно смањило ($p < 0,01$), односно био је $5,03 \pm 0,05$ log CFU/ g. Истог дана, статистички значајно ($p < 0,01$) смањење броја бактерија *Y. enterocolitica* забележено је и у узорцима кобасица ширег дијаметра

OIV групе (кобасица са стартер културом, број бактерија *Y. enterocolitica* $4,64 \pm 0,10 \log$ CFU/ g). Седмог дана испитивања просечан број бактерија *Y. enterocolitica*, код групе узорака кобасица ширег дијаметра (OII група- $5,04 \pm 0,16 \log$ CFU/ g и OIV група $4,69 \pm 0,04 \log$ CFU/ g) група, био је статистички значајно мањи ($p < 0,01$) од просечног броја бактерија нултог дана испитивања, али се није статистички значајно разликовао од просечног броја бактерија *Y. enterocolitica* код узорака ових група кобасица трећег дана испитивања. Од седмог до осамнаестог дана број бактерија *Y. enterocolitica* се смањивао, тако да је у узорцима кобасица OII групе дванаестог дана био $4,63 \pm 0,46 \log$ CFU/ g, а осамнаестог дана $4,40 \pm 0,06 \log$ CFU/ g, а узорцима кобасица OIV групе број бактерија *Y. enterocolitica* дванаестог дана био је $4,54 \pm 0,01 \log$ CFU/ g, а осамнаестог дана $4,07 \pm 0,07 \log$ CFU/ g. Између просечних бројева *Y. enterocolitica* у кобасицама OII и OIV групе седмог, дванаестог и осамнаестог дана испитивања утврђене су нумерички а и у већини случајева статистички значајне разлике ($p < 0,01$; $p < 0,05$). Просечан број *Y. enterocolitica* у свим случајевима поређења од трећег до осамнаестог дана био је мањи у узорцима кобасица OIV групе (група са стартер културом) у односу на просечан број *Y. enterocolitica* у узорцима кобасица OII (група без стартер културе). У узорцима огледних група кобасица ширег дијаметра двадесетпетог и тридесетпетог дана зрења није утврђено присуство *Y. enterocolitica*.

Просечан број ентеробактерија (**друго подпоглавље**) у надеву узорака кобасица (нулти дан) **контролних група** (KI, KII, KIII и KIV) био је $4,64 \pm 0,33 \log$ CFU/ g, а у надеву **огледних група** узорака кобасица (OI, OII, OIII и OIV) просечна број ентеробактерија био је $5,29 \pm 0,53 \log$ CFU/ g. Разлика између наведених вредности број ентеробактерија била је статистички значајна ($p < 0,01$). У току процеса зрења просечан број ентеробактерија у узорцима **кобасица ужег дијаметра** се смањивао тако да је трећег дан у кобасица KI групе био $4,39 \pm 0,01 \log$ CFU/ g, KIII групе $3,59 \pm 0,29 \log$ CFU/ g, OI групе $5,00 \pm 0,27 \log$ CFU/ g и OIII групе $4,49 \pm 0,20 \log$ CFU/ g. Статистички значајне разлике између броја ентеробактерија нултог и трећег дана испитивања утврђене су између свих група узорака кобасица са статистичком значајношћу $p < 0,01$, односно $p < 0,05$. Седмог дана зрења број ентеробактерија био је у узорцима кобасица KI групе $3,01 \pm 0,14 \log$ CFU/ g, KIII $2,47 \pm 0,11 \log$ CFU/ g, OII групе $3,93 \pm 0,11 \log$ CFU/ g и OIII групе $3,03 \pm 0,27 \log$ CFU/ g. Поређењем броја ентеробактерија истог дана зрења, трећег, односно седмог дана утврђено је да је просечан број ентеробактерија и код контролне и код огледне групе узорака кобасица са стартер културом (KIII, OIII) био статистички значајно мањи ($p < 0,01$; $p < 0,05$) од укупног броја ентеробактерија контролне и огледне групе узорака кобасица без додате стартер културе (KI, OII). Такође, просечан број ентеробактерија огледних група узорака кобасица био је статистички значајно већи ($p < 0,01$) трећег, односно седмог дана од просечног броја ентеробактерија контролних група узорака кобасица. У узорцима кобасица ужег дијаметра контролних и огледних група дванаестог и осамнаестог дана зрења (крај производног процеса) није утврђено присуство ентеробактерија.

Просечан број ентеробактерија у надеву кобасица ширег дијаметра био је код **контролне групе** (KII, KIV) $4,64 \pm 0,33 \log$ CFU/ g, а **огледне** (OII и OIV) $5,29 \pm 0,53 \log$ CFU/ g. Трећег дана зрења, укупан број ентеробактерија у узорцима кобасица KII групе био је $4,84 \pm 0,21 \log$ CFU/ g, KIV групе $4,41 \pm 0,24 \log$ CFU/ g, OII групе $5,40 \pm 0,54 \log$ CFU/ g и OIV $5,23 \pm 0,48 \log$ CFU/ g. У односу на нулти дан, односно на број ентеробактерија у надеву, разлике у броју ентеробактерија нису биле статистички значајне. До статистички значајнијег смањења броја ентеробактерија дошло је седмог, односно дванаестог дана зрења, код KII и KIV групе узорака кобасица, са значајношћу од $p < 0,01$ а код OII и OIV групе узорака кобасица са значајношћу од $p < 0,05$. Осамнаестог дана зрења укупан број ентеробактерија у кобасицама KII групе био је $3,01 \pm 0,05 \log$ CFU/ g, KIV групе $2,41 \pm 0,12 \log$ CFU/ g, OII групе $3,57 \pm 0,11 \log$ CFU/ g, KIV $2,85 \pm 0,02 \log$ CFU/ g. Поређења просечних вредности броја ентеробактерија у узорцима кобасица контролних и огледних група са и без стартер културе, показују да је просечан број ентеробактерија нумерички, а у појединим случајевима и статистички значајно мањи у узорцима кобасица са додатком стартер културе. Ентеробактерије у контролним и огледним групама кобасица ширег дијаметра нису доказане 25. као и 35. дана (крај производног процеса) зрења.

Резултати испитивања просечног **броја аеробних мезофилних бактерија** у узорцима контролних и огледних група кобасица приказани су у **трећем подпоглављу**. Просечан број аеробних мезофилних бактерија у узорцима контролне групе кобасица KI групе

(кобасице ужег дијаметра без starter културе) био је $4,61 \pm 0,20 \log \text{CFU/g}$ и растао је до дванаестог дана зрења када је био $7,85 \pm 0,64 \log \text{CFU/g}$, да би осамнаестог дана, на крају зрења био $7,01 \pm 0,09 \log \text{CFU/g}$. У узорцима кобасица KII групе истог пречника којима је додата starter култура просечан број аеробних мезофилних бактерија био је нултог дана $5,25 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$, да би дванаестог дана порастао на $8,04 \pm 0,42 \log \text{CFU/g}$, а затим осамнаестог дана зрења се смањивао на $7,45 \pm 0,10 \log \text{CFU/g}$. Пораст броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима кобасица током зрења забележен је и код **огледних група кобасица**. Тако је код OI групе узорака кобасица, просечан број аеробних мезофилних бактерија нултог дана био $6,32 \pm 0,21 \log \text{CFU/g}$, да би дванаестог дана био $7,95 \pm 0,28 \log \text{CFU/g}$, а осамнаестог дана, на крају зрења $7,42 \pm 0,09 \log \text{CFU/g}$. Слични резултати утврђени су и код узорака кобасица OIII групе где је нултог дана број аеробних мезофилних бактерија био $6,92 \pm 0,12 \log \text{CFU/g}$, дванаестог дана $8,12 \pm 0,44 \log \text{CFU/g}$ а осамнаестог дана $7,76 \pm 0,31 \log \text{CFU/g}$. Код свих испитиваних група кобасица, разлике између просечних вредности броја аеробних мезофилних бактерија у испитиваним данима (разлике измеђи 0. и 3. дана, 3. и 7. дана итд) биле су у већини случајева статистички значајне ($p < 0,01$; $p < 0,05$). Утврђено је такође да је просечан број аеробних мезофилних бактерија у узорцима кобасица KIII групе, односно OIII групе (кобасице са додатом starter културом) био нумерички и статистички значајно већи од просечног броја аеробних мезофилних бактерија KI, односно OI групе. Свих дана испитивања просечан број аеробних мезофилних бактерија у узорцима огледних група кобасица био је у већини случајева статистички значајно већи од броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима кобасица контролних група узорака. Просечан број аеробних мезофилних бактерија у надеву **контролне групе кобасица ширег дијаметра** био је у узорцима кобасица KII групе (кобасице без starter културе) нултог дана испитивања $4,61 \pm 0,20 \log \text{CFU/g}$ и растао је до осамнаестог дана када је био $8,83 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$, да би се затим смањивао и на крају зрења био $7,23 \pm 0,09 \log \text{CFU/g}$. Просечан број аеробних мезофилних бактерија KIV групе узорака кобасица (шири дијаметар са starter културом) био је нултог дана $5,25 \pm 0,15 \log \text{CFU/g}$ и статистички значајно већи ($p < 0,01$) од просечног броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима кобасица KII групе. У току зрења, просечан број аеробних мезофилних бактерија у кобасицама KIV групе (кобасице са додатком starter културе) растао је до осамнаестог дана када је био $9,63 \pm 0,17 \log \text{CFU/g}$ а затим се смањивао, да би тридесетпетог дана, на крају зрења, био $7,62 \pm 0,04 \log \text{CFU/g}$. Просечан број аеробних мезофилних бактерија у надеву **огледних група кобасица ширег дијаметра** био је нултог дана $6,32 \pm 0,11 \log \text{CFU/g}$ (OII група без starter културе) односно $6,87 \pm 0,12 \log \text{CFU/g}$ (OIV група са starter културом) и био је статистички значајно већи од просечног броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима кобасица контролних група (KII, односно KIV). У узорцима кобасица OII, односно OIV групе број аеробних мезофилних бактерија код обе групе ових кобасица растао је до осамнаестог дана, када је био $9,10 \pm 0,35 \log \text{CFU/g}$ (OII група), односно $9,24 \pm 0,18 \log \text{CFU/g}$ (OIV група). Код обе групе огледних узорака кобасица у току зрења до тридесет петог дана дошло је до смањења броја аеробних мезофилних бактерија тако да је број аеробних мезофилних бактерија у узорцима кобасица OII групе, на крају зрења, био $7,48 \pm 0,22 \log \text{CFU/g}$ а узорцима кобасица OIV групе $6,99 \pm 0,39 \log \text{CFU/g}$. Унутар истих група кобасица просечан број аеробних мезофилних бактерија био је статистички значајно различит ($p < 0,01$; $p < 0,05$) и у различитим данима испитивања. Просечан број аеробних мезофилних бактерија са starter културом и без starter културе и код узорака контролних и огледних група кобасица био је у мањем броју случајева поређења статистички значајно различит ($p < 0,01$; $p < 0,05$) што се може рећи и за разлике између контролних и огледних група кобасица.

У **Четвртном подпоглављу** приказани су резултати испитивања који се односе на утврђивање броја бактерија млечне киселине (БМК) у кобасицама огледних и контролних група у току зрења (сушења). Просечан број БМК у узорцима надева узорака кобасица **контролне KI групе ужег дијаметра** (без додате starter културе) био је $5,09 \pm 0,20 \log \text{CFU/g}$, узорака KIII групе кобасица (додата starter култура) $5,21 \pm 0,80 \log \text{CFU/g}$, узорака **огледне групе OI** (без додате starter културе) $6,23 \pm 0,90 \log \text{CFU/g}$ а узорака кобасица огледне групе OIII (са додатом starter културом) $6,66 \pm 0,18 \log \text{CFU/g}$. Између просечног броја БМК KI и KIII групе кобасица није утврђена статистички значајна разлика. У осталим случајевима поређења између просечних вредности БМК

поређених група узорака кобасица (KI и OI, KI и OIII, KIII и OI, KIII и OIII), односно OI и OIII, утврђене су статистички значајне разлике ($p < 0,01$; $p < 0,05$). У току зрења број БМК у узорцима кобасица KI групе растао је од $5,09 \pm 0,80 \log \text{CFU/g}$ до $9,25 \pm 0,35 \log \text{CFU/g}$ (дванаести дан) да би осамнаестог дана био $9,03 \pm 0,14 \log \text{CFU/g}$, у узорцима кобасица KIII од $5,21 \pm 0,80 \log \text{CFU/g}$ (нулти дан) до $9,36 \pm 0,45 \log \text{CFU/g}$ (дванаести дан), да би на крају производног процеса био $9,12 \pm 0,18 \log \text{CFU/g}$. У узорцима кобасица огледне групе OI број БМК растао је од $6,23 \pm 0,90$ (нулти дан) до $9,30 \pm 0,16 \log \text{CFU/g}$ (дванаести дан), да би осамнаестог дана био $9,20 \pm 0,24 \log \text{CFU/g}$ а у узорцима кобасица OIII групе број БМК је растао од $6,66 \pm 0,28 \log \text{CFU/g}$ (нулти дан) до $9,06 \pm 0,17 \log \text{CFU/g}$ (осамнаести дан). Трећег дана испитивања између просечног броја БМК свих испитиваних група кобасица утврђене су статистички значајне разлике ($p < 0,01$). Седмог дана испитивања у узорцима кобасица KIII групе број БМК ($9,56 \pm 0,41 \log \text{CFU/g}$) био је статистички значајно већи ($p < 0,01$; $p < 0,05$) од просечног броја БМК осталих испитиваних група (KI, OI, односно OIII). Између просечног броја БМК у узорцима кобасица KI ($8,71 \pm 0,28 \log \text{CFU/g}$), OI ($8,70 \pm 0,31 \log \text{CFU/g}$), односно OIII ($7,90 \pm 0,50 \log \text{CFU/g}$) групе нису утврђене статистички значајне разлике. Нису утврђене статистички значајне разлике између броја БМК испитиваних група кобасица дванаестог дана зрења (број БМК од $8,92 \pm 0,94 \log \text{CFU/g}$ OIII групе до $9,06 \pm 0,45 \log \text{CFU/g}$ KIII групе) као и осамнаестог дана (број БМК од $9,03 \pm 0,14 \log \text{CFU/g}$ KI групе до $9,20 \pm 0,24 \log \text{CFU/g}$ OI групе). Број БМК испитиваних група узорака кобасица, изузев дванаестог дана испитивања свих осталих дана био је статистички значајно различит ($p < 0,01$). У узорцима кобасица **ширег дијаметра** број БМК код свих група узорака кобасица (KII, KIV, OII, OIV) растао је до осамнаестог дана и то код KII групе од $5,09 \pm 0,25 \log \text{CFU/g}$ до $9,34 \pm 0,50 \log \text{CFU/g}$, KIV групе је $5,21 \pm 0,90 \log \text{CFU/g}$ до $8,97 \pm 0,13 \log \text{CFU/g}$, OII групе од $6,23 \pm 0,08 \log \text{CFU/g}$ до $9,11 \pm 0,91 \log \text{CFU/g}$, и OIV групе од $6,66 \pm 0,08 \log \text{CFU/g}$ до $9,02 \pm 0,34 \log \text{CFU/g}$, а затим је опадао до тридесет петог дана. У већини случајева поређења броја БМК између различитих група узорака кобасица истог дана зрења, као и унутар исте групе кобасица различитих дана зрења утврђене су статистички значајне разлике ($p < 0,01$; $p < 0,05$).

Резултати испитивања pH вредности узорака кобасица приказани су у **петом подпоглављу**. Нултог дана испитивања pH вредност најева кобасица била је $6,14 \pm 0,10$. Током зрења pH вредност кобасица **ужег дијаметра** је опадала, тако да је на крају зрења (осамнаести дан) била код узорака кобасица без додатка starter културе (KI група) $5,38 \pm 0,13$, а код кобасица истог дијаметра са додатком starter култура (KIII група) $5,10 \pm 0,09$. Разлика између наведених просечних pH вредности била је статистички значајна ($p < 0,05$). И код контролне групе узорака кобасица **ширег дијаметра** у току зрења дошло је такође до пада pH вредности, тако да је она код узорака кобасица без додатка starter културе (KII) била на крају зрења $5,19 \pm 0,05$, а узорака кобасица са додатком starter културе (KIV) $4,98 \pm 0,09$ (разлика статистички значајна, $p < 0,01$).

На крају зрења pH вредност узорака OI групе (без додате starter културе) узорака кобасица **ужег дијаметра** била је $5,40 \pm 0,06$, а OIII групе узорака кобасица (са додатком starter културом) истог дијаметра $5,24 \pm 0,08$ (разлика статистички значајна, $p < 0,05$). Код узорака кобасица **ширег дијаметра** OII групе (без додатка starter културе) pH вредност на крају зрења, тридесетпетог дана, била је $5,24 \pm 0,03$, а код узорака кобасица OIV групе (са додатком starter културе) истог дијаметра $5,07 \pm 0,05$ (разлика статистички значајна, $p < 0,05$).

У **шестом подпоглављу** приказани су резултати испитивања a_w вредности узорака група кобасица. Утврђено је да је просечна a_w вредност најева кобасица нултог дана испитивања била $0,9695 \pm 0,0007$. Код узорака кобасица **ужег дијаметра** a_w вредност у току зрења се смањивала и на крају, осамнаестог дана, зрења била је код контролне KI групе узорака кобасица (без додате starter културе) $0,9110 \pm 0,0006$ и статистички значајно мања ($p < 0,01$) од a_w вредност узорака кобасица истог дијаметра KIII групе (са додатком starter културе) где је a_w вредност била $0,9211 \pm 0,0005$. Просечна a_w вредност узорака **контролне групе кобасица ширег дијаметра** KII групе ($0,9346 \pm 0,0008$) била је статистички значајно мања ($p < 0,05$) од просечних a_w вредности ($0,9361 \pm 0,0008$) кобасица KIV групе. На крају зрења a_w вредност узорака кобасица **ужег дијаметра** OI групе била је $0,9200 \pm 0,0007$ и била је статистички значајно мања ($p < 0,05$) од просечне a_w вредности ($0,9235 \pm 0,0004$) узорака кобасица OIII групе. Такође, просечна a_w вредност ($0,9359 \pm 0,0006$) узорака огледне групе кобасица **ширег**

дијаметра (OII) била је статистички значајно мања ($p < 0,05$) од просечне a_w вредности ($0,9379 \pm 0,0005$) узорака кобасица OIV групе.

Просечан хемијски састав узорака кобасица приказан је у **седмом подпоглављу**. Садржај воде у **узорцима кобасица** ужег дијаметра био је од $28,19 \pm 1,37$ (KI група) до $29,64 \pm 0,95$ (OIII група), масти од $40,03 \pm 0,34\%$ (OIII група) до $40,87 \pm 1,52\%$ (KI група), протеина од $25,42 \pm 0,23\%$ (OIII група) до $25,67 \pm 0,79\%$ (KI група), пепела од $5,17 \pm 0,31\%$ (KIII група) до $5,28 \pm 0,45\%$ (KI група), и NaCl од $3,98 \pm 0,36\%$ (KIII група) до $4,09 \pm 0,55\%$ (KI група). Просечан садржај воде у узорцима **кобасица ширег дијаметра** био је од $28,45 \pm 1,20\%$ (OII група) до $29,87 \pm 1,64\%$ (OIV група), масти од $39,21 \pm 1,78\%$ (KIV група) до $39,92 \pm 1,23\%$ (OII група), протеина од $25,33 \pm 1,45\%$ (KIV група) до $25,38 \pm 1,70\%$ (KII група), пепела од $5,20 \pm 0,10\%$ (KIV група) до $5,29 \pm 0,07\%$ (KII група), NaCl од $3,99 \pm 0,83\%$ (KIV група) до $4,08 \pm 0,07\%$ (KII група). Између просечних вредности испитиваних хемијских параметара квалитета узорака кобасица ужег, односно ширег дијаметра нису утврђене статистичке значајне разлике.

У поглављу **Дискусија** кандидат критички разматра добијене резултате и пореди их са резултатима других аутора.

VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА:

На основу извршених испитивања и добијених резултата закључено је следеће:

1. У ферментисаним кобасицама ужег и ширег дијаметра са и без додате starter културе у току зрења број бактерија *Y. enterocolitica* се смањивао. Број бактерија *Y. enterocolitica* био је свих дана испитивања статистички значајно мањи у узорцима кобасица којима је додата starter култура. У узорцима кобасица ужег дијаметра дванаестог дана, а у узорцима кобасица ширег дијаметра двадесетпетог дана зрења није утврђено присуство *Y. enterocolitica*.

2. Просечан број ентеробактерија у току зрења у узорцима ферментисаних кобасица ужег и ширег дијаметра се статистички значајно смањивао и био је израженији у узорцима кобасица контролне и огледне групе са додатком starter култура. Код кобасица ужег дијаметра ентеробактерије нису доказане дванаестог дана, као и на крају процеса зрења, а у узорцима кобасица ширег дијаметра ентеробактерије нису доказане двадесетпетог дана, као и на крају процеса зрења.

3. Просечан број аеробних мезофилних бактерија у узорцима ферментисаних кобасица ужег, односно ширег дијаметра је статистички значајно растао до дванаестог, односно до осамнаестог дана зрења, а затим се до краја процеса зрења статистички значајно смањивао.

4. Као и код броја аеробних мезофилних бактерија, тако је и број бактерија млечне киселине у узорцима ферментисаних кобасица ужег, односно ширег дијаметра, статистички значајно растао до дванаестог, односно до осамнаестог дана зрења, а затим се до краја процеса зрења статистички значајно смањивао.

5. Вредност pH свих испитиваних група узорака ферментисаних кобасица се у току процеса зрења статистички значајно смањивала и на крају зрења била је статистички значајно нижа у узорцима кобасица ширег дијаметра, односно код узорака кобасица код којих су коришћене starter културе.

6. У току процеса зрења, контролних и огледних група узорака ферментисаних кобасица ужег и ширег дијаметра a_w вредност се статистички значајно смањивала и била је мања у узорцима кобасица у којима су коришћене starter културе.

7. На крају производног процеса узорака ферментисаних кобасица контролних, односно огледних група, кобасица ужег и ширег дијаметра нису утврђене значајније разлике између испитиваних хемијских параметара квалитета кобасица.

VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:

Добијени резултати приказани су табеларно и графички и на основу тога тумачени. Тумачење резултата је дато јасно и разумљиво.

VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Дисертација је у свему написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију?

Докторска дисертација Радмиле Митровић садржи све битне елементе који се захтевају за завршену докторску дисертацију.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Докторска дисертација Радмиле Митровић је оригиналан допринос науци будући да даје податке о промени броја *Yersinia enterocolitica*, броја ентеробактерија, броја аеробних мезофилних бактерија и броја бактерија млечне киселине у ферментисаним кобасицама ужег и ширег дијаметра у току зрења. Значај ових испитивања везан је за чињеницу да месо свиња може да буде контаминирано *Yersinia enterocolitica* и да се овај микроорганизам може наћи у производима од меса, посебно оним који нису термички обрађени, као што је то случај са ферментисаним кобасицама, које се називају још и сирове кобасице и код којих се конзервишући ефекат заснива, пре свега, на смањењу a_w и рН вредности. Резултати испитивања показују да зрење, односно сушење ферментисаних кобасица ужег и ширег дијаметра осигурава добијање безбедног производа, односно да ферментисане кобасице на крају зрења не садрже *Yersinia enterocolitica*.

IX ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

19.02.2016

др Милан Ж. Балтић, редовни професор у пензији
Факултет ветеринарске медицине,
Универзитета у Београду

др Владо Теодоровић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине,
Универзитета у Београду

др Драган Василев, доцент
Факултет ветеринарске медицине,
Универзитета у Београду

др Јелена Ивановић, научни сарадник
Факултет ветеринарске медицине,
Универзитета у Београду

др Весна Ђорђевић, научни сарадник
Институт за хигијену и технологију меса
Београд