

Датум: 27.05.2021.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Душанке Пауновић, мастер инжењера технологије

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, бр. 32/27-5.4. од 26.05.2021. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације мастер инжењера Душанке Пауновић под насловом „*Tartuf (Tuber sp.): микрофлора, ароматична једињења и примена у производњи сира*“.

Комисија у саставу др Зорица Радуловић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Миомир Никшић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Веле Тешевић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, др Јелена Миочиновић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Милица Мирковић, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду прегледала је поднету докторску дисертацију и о томе подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1 Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Душанке Пауновић, мастер имж. тех., написана је на 113 страна текста, укључујући 58 табела, 3 графика и 32 слике, а цитирано је 303 референце из изворне научне литературе. Дисертација садржи сажетак са кључним речима на српском и енглеском језику.

Дисертација садржи следећих осам поглавља: 1. Увод (стр. 1-2), 2. Преглед литературе (стр. 3-26), 3. Циљ истраживања (стр. 27), 4. Материјал и методе (стр. 28-37), 5. Резултати и дискусија (стр.38- 74), 6. Закључци (стр. 75- 78), 7. Литература (79-100), 8. Прилог (стр. 101-113). 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 преглед историјата проналажења тартуфа у Србији, а потом је истакла да тартуф, као ектомикоризна врста, развија подземне јестиве плодове, аскокарпе, у симбиози са кореном биљака, најчешће храста, липе, граба, тополе, бора и др., зависно од врсте тартуфа. Животни циклус тартуфа почиње фазом вегетативног раста хифа, које успостављају контакт са кореном биљке домаћина градећи симбиозу, која доводи до развоја ектомикоризе. Истраживања микрофлоре ектомикоризне заједнице тартуфа и плодноносних тела тартуфа, показују да разноврсну микробну заједницу чине бактерије, квасци, филаментозне гљиве. Плодносна тела тартуфа карактерише јака, комплексна арома, мешавина испарљивих

једињења и имају јединствен механизам за апсорпцију хранљивих материја из земљишта заједно са биљком домаћиним. Поред биолошке функције, мешавина испарљивих једињења емитованих из плодноносних тела, одређује њихову економску вредност. Садржај ароматичних материја у тартуфима је променљив и зависи од више фактора, како од биљке домаћина, присутне микрофлоре, тако и од вегетативног периода, старости тартуфа, генетског фактора и региона са кога потиче. До данас је изоловано и идентификовано више од 200 испарљивих једињења из плодноносних тела тартуфа, велики број масних киселина, терпеноида, ароматичних једињења и једињења која садрже сумпор.

Тартуфи су лако кварљива храна и главни проблем је одржавање ароматичних материја које дају квалитет тартуфа. Начин чувања тартуфа треба да обезбеди очување хемијских и сензорних својстава тартуфа, како би се његовом применом у прехранбеној индустрији, добио производ адекватних сензорних карактеристика.

Примена тартуфа, као додаток храни, пићу и разним другим производима је последњих година све већа. Међутим, прехранбени производи са додатком тартуфа, који се данас налазе на тржишту, базирају углавном на примени вештачких арома, које су главни носиоци ароме у производу. Проналажење технике која би омогућила очување природне ароме тартуфа, а самим тим и могућност добијања прехранбених производа са природном аромом тартуфа, још увек није потпуно истражена. Са друге стране, проналажење начина да се очува природна арома тартуфа и инкорпорира у прехранбене производе, омогућило би да се производња прехранбених производа са тартуфима може одвијати током целе године.

Имајући у виду специфичност настанка ароме тартуфа и решавање проблема њеног очувања током складиштења, а касније и примену тартуфа у производњи сирева са аутохтоним потенцијалним пробиотским бактеријама млечне киселине, могуће је добијање атрактивног прехранбеног производа који је комплетно пореклом из Србије.

Преглед литературе - Ово поглавље се састоји од девет потпоглавља. У првом делу овог поглавља кандидаткиња истиче улогу и значај микоризе у животном циклусу тартуфа. Тартуфи, ектомикоризне гљиве, припадају реду *Pezizales*, раздео *Ascomycota*. Микоризу успостављају са кореном *Gymnospermi* и *Angiospermi*, образујући плодносна тела, аскокарпе, обично неправилно округлог облика и меснате конзистенције. Животни циклус тартуфа, почиње фазом вегетивног раста хифа, које успостављају контакт са кореном биљке домаћина градећи симбиозу, која доводи до развоја ектомикоризе. У завршној фази, мицелијум је организован у плодносно тело које формира споре. Плодносна тела тартуфа ослобађају мешавину испарљивих једињења која се вероватно користе за комуникацију са биљкама, животињама и микроорганизмима. Поред њихове биолошке функције, мешавина испарљивих једињења, (арома), емитованих из плодних тела, одређује њихову економску вредност. У потпоглављу **Тартуфи**, кандидаткиња је дала поделу тартуфа и описала њихове карактеристике, а затим је дала акценат на микрофлору тартуфа, која се током вегетационог периода формира зависно од биљке домаћина. Процес сазревања/меланизације, формирања глеба, стварање спора унутар глеба, траје неколико месеци. Истраживања микрофлоре ектомикоризне заједнице плодноносних тела тартуфа, показују да разноврсну микробну заједницу чине бактерије, квасци и филаментозне гљиве. Бактерије у тлу колонизују примордије тартуфа, пре диференцијације аскокарпних ткива, при чему се састав бактеријске заједнице мења током сазревања аскокарпа тартуфа. Промене микрофлоре у перидијуму повезане су са спољашњом температуром, климатским условима, географским регионом и др. У потпоглављу **Микробиота тартуфа**, кандидаткиња је истакла да су досадашња

истраживања показала да површина плодносног тела тартуфа, као и унутрашњост плода тартуфа, садрже неколико стотина бактеријских заједница. Микробиота плодносних тела је слична код свих до сада проучаваних врста тартуфа и углавном се састоји *α-Proteobacteria* из породице *Bradirhizobiaceae* док разлике постоје у микробиому различитих врста тартуфа. Неке бактерије учествују у разградњи и синтези сложених испарљивих аромогених једињења тартуфа. Бактерије мобилизацијом хранљивих материја из минерала или производњом испарљивих органских једињења, који су у вези са другим микроорганизмима (квасцима и другим гљивама) су повезани са *Tuber* sp. и доприносе формирању ароме тартуфа. Микробиота тартуфа се разликују по врстама тартуфа, али доминирају бактерије из реда *Rhizobiales*, *Actinomycetales*, *Enterobacteriales*, *Flavobacteriales* и *Pseudomonadales*. Филаментозне гљиве, као и паразитске врсте микроорганизма из микоризне заједнице, примењују се у биоконтроли фито- и микопатогених гљива, представљају велики изазов за истраживаче. У потпоглављу **Ароматичност тартуфа** кандидаткиња је истакла да арома може варирати од благе до интензивне, попут земљаних, мошусних и оштрих, белог лука, меснате ноте, воћне, сира, ружа, путера, а потичу од испарљивих органских једињења, којих је до сада идентификовано више од 200 (алкохоли, алдехиди, естри, испарљива сумпорна једињења и др.). Испарљива ароматична једињења тартуфа мерило су квалитета тартуфа као гастрономског специјалитета. Многобројна истраживања, показала су да арома тартуфа потиче од лако испарљивих једињења угљеника, ниске молекулске масе, у литератури позната као испарљива органска једињења. У потпоглављу **Третмани за очување природне ароме тартуфа**, кандидаткиња је истакла да постоји неколико техника, као што је паковање у модификованој атмосфери, складиштење на ниским температурама, физички третмани, хемијски третмани или чак и више софистициране технике, као озрачивања са гама зрацима. Замрзавања на -20°C , -80°C и лиофилизације тартуфа у циљу смањења ензимских реакција и губитка испарљивих једињења, очување ароматичних материја пореклом из тартуфа, су неке од могућих метода да се добије производ са природном аромом тартуфа током целе године. Примена тартуфа као додаток храни, пићу и разним другим прехранбеним производима последњих година све је већа, па је проналажење технике која би омогућила очување природне ароме тартуфа, а самим тим и могућност добијања прехранбених производа са природном аромом тартуфа, још увек је у фази истраживања. Код тартуфа је велики проблем очување садржаја испарљивих једињења који током времена и неадекватног чувања (оксидацијом и под утицајем ензимских реакција), прелазе у друга, мање вредна или штетна једињења за квалитет тартуфа. Зато су током времена истраживани поступци и технологије који би обезбедили очување квалитета тартуфа. У делу **Примена тартуфа у храни**, кандидаткиња је навела литературне податке о могућности примене тартуфа у пићу и разним прехранбеним производима. Додатни изазов који је кандидаткиња навела је да испита могућност примене тартуфа (свежих и замрзнутих различитим режимима) у производњи сирева добијених додавањем аутохтоних потенцијалних пробиотских бактерија млечне киселине. У потпоглављу **Производња и својства сирева холандског типа**, кандидаткиња је описала карактеристике процеса производње и зрења полутврдих сирева холандског типа, као што су гауда и едамски сир. Зрење сирева холандског типа може да траје од 1 до 20 месеци што значајно утиче на састав и својства финалног производа. Примера ради зрели сиреви се одликују мањим садржајем воде и већим садржајем масти и соли, као и већим садржајем органских киселина. Такође, сензорна својства холандских сирева великим делом зависе од степена зрелости. Зрење холандских сирева се одвија на температури $10-18^{\circ}\text{C}$ при чему се одвија читав сет биохемијских промена, у првом реду протеолитичке промене, а потом гликолитичке и

липолитичке промене. У променама током зрења настају бројна једињења која утичу на формирање укуса и мириса ових сирева. Испитивањем комерцијалних сирева са тржишта различитих земаља су идентификована 93 ароматична једињења која могу да имају значај за формирање укуса и мириса гауда сира. Као кључна ароматична испарљива једињења аутори наводе диацетил, 2- и 3-метил-бутанал, 2-метил-пропанал, метионин, етил-бутират, сирћетну киселину, бутерну киселину, хомофуранеол и 2-изобутил-3-метоксипирозин. Кандидаткиња је истакла да се састав испарљивих једињења мења током зрења сирева и навела податке да је методом GC-MS идентификовано 25 једињења која обухватају слободне масне киселине, сумпорна једињења, алдехиде, естре, пирозин, лактон, фуранон, диацетил, ацетоин, пирулин. Ова једињења укључују сирћетну киселину, бутерну киселину, хексанску киселину, диметил сулфид, диметил трисулфид, метионин, хексанал, хептанал, диацетил, етил бутират и 2- и 3-метил-бутанал. Кандидаткиња је у потпоглављу **Пробиотици и примена у функционалној храни** дала дефиницију пробиотика и критеријуме за селекцију нових пробиотских сојева бактерија млечне киселине. С обзиром на распрострањеност бактерија млечне киселине (гастроинтестинални тракт, ферментисани биљни производи, традиционални млечни производи, итд.), истраживањима је установљено да бројни изолати из различитих средина могу да поседују пробиотске карактеристике. Аутохтоне бактерије млечне киселине изоловане из традиционалних сирева представљају велики потенцијал за селекцију нових потенцијалних пробиотских сојева, па се последњих година, осим селекције бактерија млечне киселине у циљу примене као стартер култура, као један од основних критеријума за селекцију, примењује испитивање потенцијалних пробиотских карактеристика. Такође, кандидаткиња је дала преглед клинички доказаних здравствених ефеката које остварују пробиотске бактерије. Кандидаткиња истиче да појам функционалне хране, по дефиницији представља храну која поред свог основног, нутритивног садржаја, може бити обогаћена додатним компонентама, као што су пробиотици. Производња различите функционалне хране са пробиотским бактеријама, које остварују многобројне позитивне ефекте на људско здравље, у последње време нарочито добија на значају. У последњем делу овог потпоглавља кандидаткиња је дала преглед примене пробиотика у производњи ферментисаних производа од млека и различитих врста сирева.

Циљ истраживања - Како се тартуфи скупљају сезонски, нема их током целе године, проблем складиштења и адекватног чувања, односно задржавање сензорних особина тартуфа, веома је захтеван задатак.

Садржај испарљивих материја се мења у зависности од тога да ли је тартуф свеж или складиштен, а промена састава ароматичних материја током складиштења одређује трајност производа. Циљ овог рада је био проналажење начина да се очува природна арома тартуфа и инкорпорира у пехрамбене производе, што би омогућило да се производња прехранбених производа са тартуфима може одвијати током целе године. Уместо употребе вештачких арома, добијање прехранбеног производа са потпуно природним компонентама, представља иновативно технолошко решење, које подразумева примену аутохтоних потенцијалних пробиотских бактерија, као и аутохтоних свежих и смрзнутих тартуфа у производњи сирева високог сензорног квалитета без вештачких арома.

Због свега тога, кандидат је истакао следеће циљеве овог рада:

1. Изолација и идентификација бактерија, квасаца и филаментозних гљива пореклом из плодноносних тела црног тартуфа (*Tuber aestivum*)

2. Испитивање утицаја лиофилизације и замрзавања тартуфа на -20°C , -80°C са и без претходног замрзавања течним азотом на очување ароматичности тартуфа, раздвајањем, идентификацијом и квантификацијом испарљивих органских једињења у свежем и смрзнутим тартуфима

4. Примена тартуфа у производњи сира, са додатком аутохтоног потенцијалног пробиотског соја *Lactobacillus plantarum* 564 и утврђивање микробиолошке слике сирева, хемијског састава, тока зрења и садржаја испарљивих ароматичних материја сирева током 90 дана складиштења, као и сензорне карактеристике добијеног производа.

Материјал и методе – Ово поглавље је кандидаткиња поделила у 11 потпоглавља, у којима су наведени материјал за рад и следеће методе:

1. Из спороносних тела тартуфа *Tuber aestivum*, применом селективних подлога извршена је изолација микроорганизама: бактерија, квасаца, актиномицета и гљива класичним микробиолошким методама, на одговарајућим селективним подлогама.

2. Биохемијска карактеризација добијених изолата урађена је коришћењем API система (bio Merieux, Marcu I Etolie, France). У зависности од групе бактерија која се испитује, коришћени су различити API системи, (API CH50, API 20 Strip, API 20C AUX и API 20 NE. Очитавање резултата је вршено применом програма API Lab plus софтвера.

3. Молекуларно-генетичка детерминација ДНК изолација и PCR амплификација изолата (Thomson et al., 1994.; Žare and Gams 2001; Altschul et al., 1997), утврђена је умножавањем гена за 16S rRNA PCR методом, биоинформатичком обрадом секвенци и испитивањем филогенетском односа изолата са најсроднијим референтним изолатима.

4. Замрзавање на -20°C и -80°C (Mencarelli et al., 1997) са и без претходног замрзавања у течном азоту на -196°C , и лиофилизација (Seballos et al., 2012), као начин чувања сензорних карактеристика

5. За раздвајање ароматичних испарљивих једињења примењена је статичка headspace GC/MS анализа, гасном хроматографијом, (GC), идентификација и квантификација органских испарљивих једињења пре и после замрзавања тартуфа (MS) (Palasios, et al., 2012).

6. Третмани за деконтаминацију тартуфа и примену у производњи сирева: фламбуирањем и аутоклавирањем

7. Одређивање испарљивих ароматичних једињења у третираним тартуфима припремљеним за примену у производњи сирева

8. Примена тартуфа у производњи шест варијанти полутврдог сира са аутохтоним потенцијалним пробиотиком *Lactobacillus plantarum* 564 и то: без додавања тартуфа, са додатком свежег аутоклавираног, са свежим фламбуираним, са смрзнутим аутоклавираним, са смрзнутим фламбуираним, са вештачком аромом

9. Одређивање микробиолошког статуса сирева, хемијског састава и детекција испарљивих једињења методом гасне хроматографије-масене спектрометрије (Villares i dr.2012.) током 90 дана складиштења сирева

10. Сензорне карактеристике сирева је извршила комисија, који су прошли обуку за сензорно оцењивање, применом коригованог петобалног бод система (Радовановић и Попов-Раљић, 2001)

11. Сви резултати су статистички обрађени, у складу са типом експеримента и природом података, применом програма Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, SAD).

Резултати и дискусија - Ово поглавље је подељено у 11 потпоглавља. У потпоглављима који се тичу **Идентификације микробних изолата тартуфа**, са површине и унутрашњости аскокарпа тартуфа, добијено је укупно 35 бактеријских изолата (26 са површине и 9 из унутрашњости аскокарпа), а идентификацијом одговарајућим API тестом је показано да су у највећем броју присутне врсте су биле из рода *Bacillus* 20, затим по 3 изолата из родова *Pseudomonas* и *Aeromonas*, по 2 изолата *Staphylococcus* sp. и *Brevibacillus brevis*, по 1 из родова *Arthrobacter* и *Microbacterium*. Молекуларном идентификацијом је утврђено да од добијеног броја изолата, 19 изолата припада врстама рода *Bacillus*, од којих је 18 изоловано са површине и 1 из унутрашњости аскокарпа. Остали сојеви су сврстани у 6 родова: *Pseudomonas* sp. (4), *Staphylococcus* sp. (3), *Brevibacterium* sp. (2), *Microbacterium* sp. (1), *Enterococcus* sp. (1) и *Arthrobacter* sp. (1). Присутна бактеријска популација се може довести у везу са продукцијом испарљивих једињења, која се ослобођају као резултат интеракције тартуфа и бактерија. Бактерије које ступају у интеракцију са тартуфима могу активирати њихове биосинтетске путеве који су иначе потиснути у чистим мицелијским културама. Код идентификације актиномицета, селектовано је 5 различитих изолата, од којих су 2 припадала роду *Actinomyces*, а 3 роду *Streptomyces*. Идентификоване су филаментозне гљиве: *Penicillium notatum*, *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. и *Trichoderma* sp. Резултати API теста су показали присуство следећих квасаца: *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus humicalus* и *Kloeckera apiculata*. на основу 18s rRNK, идентификовани су као *Cryptococcus*, *Debaromyces hanseinii*, *Candida fermentati* и *Rhodotorula mucilaginosa*.

У потпоглављу **Замрзавање тартуфа**, кандидаткиња је показала да је детектовано 57 испарљивих једињења, од којих је 26 издвојено као значајнија ароматична једињења. Издвојена једињења су једињења која садрже сумпор (5), алдехиди (7), кетони (4), алкохоли (6) и фурани (4). Међу њима су 2-бутанон и 2-бутанол били квантитативно доминантни и чинили су више од 50% укупне ароме у свим испитиваним узорцима.

При свим режимима замрзавања, промене у садржају сумпорних једињења су биле веома сличне, при чему је садржај метантиола код режима -20°C , 90- тог дана био већи у односу на остала сумпорна једињења. Сумпорна једињења настају из катаболизма Л-метионина, њиховог главног претече. Разноликост испарљивих супстанци које садрже сумпор имају важну улогу у формирању ароматичних профила због њиховог ниског олфакторног прага. Садржај укупних алдехида је варирао у погледу појединачних једињења. Као главни испарљиви алдехиди детектовани су: ацеталдехид, 2-метил-пропанал, 2-метил-бутанал и 3-метил-бутанал.

Сам процес замрзавања је утицао на смањење концентрације ацеталдехида, тако да је у нултом дану она била дупло мања у односу на свеж тартуф. Садржај 2-метил-пропанала се није значајно мењао у зависности од третмана замрзавања. Током чувања, садржај 2-метил-пропанала се смањивао тако да је након 90 дана релативна концентрација у свим узорцима опала приближно двадесет пута. Концентрација 2-метил-бутанала је показала тренд раста, при чему се показало да одмах након замрзавања при свим режимима, концентрација је већа него код свежег тартуфа у нултом дану. Током чувања, код свих узорака садржај 2-метил-бутанала се повећавао, осим код узорка третираног у течном азоту и чуваног на -20°C у 90-ом дану. Ранија истраживања су показала да су једињења 2-метилбутанал и 3-метилбутанал уобичајени састојци ароматичних материја тартуфа. Такође, кетони се јављају као ароматичне испарљиве супстанце и других печурака, синтетизоване путем β -оксидације масних киселина. У овом раду 2-бутанон је доминантна испарљива кетонска компонента. Осим њега, резултати су показали да у оквиру кетона се појављују: 2,3-бутанедион, 2,3-пентанедион, 3-октанон. Присуство ових кетона извесно је доказано у неким црним тартуфима. Концентрација 2-бутанона

се вишеструко повећала (24 пута) у свим режимима замрзавања, осим код лиофилизације у нултом дану у односу на свеж тартуф и одржавала на високом нивоу све до 90. дана чувања. Код лиофилизације, садржај овог једињења у нултом дану је био приближан као код свежег тартуфа и на том нивоу се одржавао до краја процеса чувања. У погледу садржаја алкохола, праћено је 6 једињења током 90 дана чувања: етанол, 2-бутанол, 1-пропанол, 2-метил-1-пропанол, 2-метил 1-бутанол, 1-октен-3-ол. Утврђено је највеће присуство 2-бутанола, при чему режими замрзавања нису имали утицаја на садржај 2- бутанола у нултом дану, а током времена релативни удео овог једињења се значајно повећавао, тако да је у 90. дану смрзнутих тартуфа, садржај је био већи него у свежем тартуфу. Највеће концентрације овог једињења су добијене смрзавањем на -20°C у 90. дану, а у случају примене лиофилизације, садржај овог једињења се драстично смањило. Резултати су показали да класу деривата фурана представљају фуран, 3-метил-фуран, 2-пентил-фуран и 2-фуран-метанол. У погледу садржаја једињења фуран, лиофилизација се показала као нешто бољи режим замрзавања у односу на остале. У подпоглављу **Третмани за деконтаминацију тартуфа**, кандидаткиња је дала осврт на значај деконтаминације тартуфа у циљу микробиолошке безбедности производње хране, а са друге стране на састав ароматичних материја, како би се одабрао оптимални начин за безбедну примену тартуфа у производњи сирева, а да се сачувају ароматичне материје. Као најбезбеднији начин припреме таруфа, одабран је поступак аутоклавирања тартуфа и поступак фламбирања. Поступак деконтаминације аутоклавирањем је показао бољи ефекат, где је постигнута потпуна стерилност, док је поступак фламбирања показао такође веома добар учинак. Код свежег тартуфа, који је био опран четком под млазом воде, присуство од 10^7 cfu/g мезофилних бактерија пре третмана, који се поступком фламбирања смањило на ниво од 10^3 cfu/g. У оквиру укупног броја мезофилних бактерија доминантне су биле врсте рода *Bacillus*, које су у свежем тартуфу биле на нивоу 10^5 cfu/g, а након фламбирања број је био 10^2 cfu/g. Ентеробактерије и колиформне бактерије нису детектоване у фламбираним тартуфу, а број сулфиторедукујућих кластридија је пао на 11 cfu/g. У потпоглављу **Ароматична једињења третираних тартуфа и вештачке ароме** детектовано је 87 једињења у тартуфима након третмана деконтаминације, од којих су издвојена 26 једињења која су била доминантна и даље разматрани. Резултати садржаја ароматичних једињења у тартуфима, након фламбирања и аутоклавирања, су показали да је у погледу садржаја издвојених једињења, фламбирање поступак којим се боље чувају ароматичне материје у тартуфу. Изутетак се показао код садржаја диметил-сулфида (ДМС), ацет-алдехида, хексанала, 2-метил-1-пропанола и 2,3-бутандиона.

У односу на ароматична једињења свежег тартуфа, код фламбираних таруфа се показало да је код сумпорних једињења садржај метантиола био већи (0,76%), док је садржај ДМС био мањи (0,15%), а садржај осталих сумпорних једињења је био приближан. Што се тиче садржаја алдехида, показало се да се код фламбираних тартуфа повећао садржај ацеталдехида, а садржај 2-метил-пропанола, се повећао чак три пута у односу на свеж тартуф. Садржај осталих алдехида код свежег и фламбираних тартуфа је био приближан. Садржај кетона код фламбираних тартуфа се није значајно разликовао у односу на свеж тартуф, осим код садржаја 3-октанона, који се смањило један и по пут. У погледу алкохола треба истаћи да у фламбираним тартуфима се за око два пута повећао садржај и 1-октен-3-ола, који има важну улогу у формирању ароме тартуфа. Ароматични састав вештачке ароме је показао присуство само 6 аромогених једињења, а највећи део ароматичности припада сумпорном једињењу 2,4-ди-тио-пентан, 94,91%, док је ди-метил-дисулфид (ДМДС) био заступљен само са 0,16%. Према литературним подацима, познато је да се присуство 2,4-ди-тио-

пентана везује само за ароматичне материје белог тартуфа *T. magmatim*. У подпоглављу **Микробиолошки статус сирева** кандидаткиња је истакла два аспекта. Један се односи на микробиолошку безбедност и хигијену, а други на активност бактерија млечне киселине, које су великим делом одговорне за правилну ферментацију и процес зрења сирева. Резултати су показали да у свим узорцима сирева током 90 дана зрења, није детектовано присуство ентеробактерија, што је потврдило да је поступак производње сирева задовољио хигијенске критеријуме. Такође, одсуство спорогених сулфиторедукујућих бактерија је показало да је поступак фламбирања правилно спроведен. Када се ради о варијантама сирева са додатим фламбираним тартуфима (свеж фламбиран СВФ и смрзнут фламбиран СМФ) детектован је број стартер култура и аутохтоних пробиотских бактерија, који је за цео 1 log био већи у односу на остале варијанте и износио 9 log јединица. Може се претпоставити да је додавање тартуфа стимулисало раст бактерија млечне киселине, пре свега активношћу ензима тартуфа, који нису били уништени термичким третманом припреме тартуфа (фламбирањем). С обзиром да је за пробиотике, веома важно присуство у великом броју, достигнути број у свим варијантама од 8-9 лог јединица је био веома задовољавајући. У делу **Хемијски састав сирева** показано је да сиреви припадају групи пуномасних сирева, а према садржају воде у безмасној материји, сиреви се могу сврстати у категорију тврдих сирева, мада су били близу граничних вредности за полутврде сиреве (54%). Сви параметри састава сирева су указивали да добијени сиреви одговарају групи сирева холандског типа. У потпоглављу **Протеолитички параметри током зрења сирева** је приказан значај одвијања бројних биохемијских промена које обухватају промене на протеинима, мастима и угљеним хидратима, а доприносе формирању великог броја различитих једињења које доприносе дефинисању сензорних својстава сирева, при чему су протеолитичке промене најважнији сегмент зрења сирева. Установљена је значајна разлика у коефицијенту зрелости између испитиваних сирева, при чему су контролни сир и сиреви са аутоклавираним тартуфима (пре или након смрзавања) имали нижи коефицијент зрелости у интервалу од 14,31 до 16,67%, док су сиреви произведени са фламбираним тартуфима без обзира да ли су коришћени свежи или смрзавани показали значајно већи коефицијент зрелости који се кретао у интервалу 24,63 до 25,53%. Резултати електрофорезе разградње протеина су у складу са резултатима о коефицијенту зрелости, па је израженија протеолиза код сирева који су произведени са фламбираним тартуфима. Овај резултат је у складу са повећаним бројем стартер и пробиотске културе у овим варијантама сирева, јер доприносе бржем зрењу сирева. Евидентно је да фламбирани тартуфи са собом носе одређени ензиматски систем који доприноси повећаном обиму протеолизе и стимулише раст стартер и допунске културе. Анализом присуства ароматичних једињења у потпоглављу **Ароматичне материје сирева** је утврђено да се током периода зрења садржај ароматичних материја мењао у интервалу од 60. до 90. дана зрења. У погледу састава компоненти ароматичности није било значајних разлика у присуству различитих једињења, тако да је у обе тачке испитивања детектовано присуство сумпорних једињења, алдехида, кетона, алкохола, док фурани нису детектовани. С обзиром да се ароматична једињења добијају бројним примарним и секундарним биохемијским реакцијама које се одвијају током зрења сирева и да се садржај испарљивих компоненти повећава током зрења, разумљиво је да је релативни удео ових једињења већи у завршним фазама зрења. Анализом сумпорних једињења је утврђено да у свим варијантама сирева без додатка вештачке ароме није детектовано присуство сумпорних једињења. Недостатак сумпорних једињења није био очекиван код свих осталих варијанти сирева, поготово што се на сензорној оцени сирева показало да сиреви имају пријатан мирис на тартуфе. Међутим, имајући у виду да се током смрзавања и термичке

деконтаминације знатно смањује садржај сумпорних једињења, додати тартуфи у сир су у старту имали низак садржај ових једињења. Јасно је да је у сложеним биохемијским променама у сиру током зрења дошло до биохемијских промена у којима су се ова једињења трансформисала. Анализом релативног удела кетона, утврђено је да су они били најзасупљенији код варијанти сирева са свежим и замрзнутим фламбираним тартуфима (СВФ и СМФ), што је у складу са подацима о присуству ових једињења код тартуфа припремљених за примену у производњи сирева. Једињење 2,3-бутандион је ароматично једињење које може да настане активношћу starter култура метаболизмом пирогрођане киселине и цитрата. Ову чињеницу потврђује и податак да је ово једињење идентификовано и у контролном сиру без тартуфа (5,25%). Познато је да се ово једињење налази у сиревима холандског типа и настаје из диацетила и ацетоина који су повезани реверзибилним реакцијама, при чему даје пријатну арому на маслац и крем. Међутим, када се погледају вредности релативног удела овог једињења, евидентно је да је садржај овог једињења у сиревима са фламбираним тартуфима највећи (СВФ=24,3% и СМФ=19,6%), потом су сиреви са аутоклавираним тартуфима и сиреви са вештачком аромом, а контролни сир има најмањи удео овог једињења (5,25%). Већи садржај овог једињења у сиревима са тартуфима је јасна последица додавања тартуфа, поготово када се узме у обзир висок садржај овог једињења у фламбираним тартуфима. У контролном сиру старом 90 дана, садржај овог једињења је био најнижи (0,35%), док је у сиру са смрзнутим фламбираним тартуфом, садржај овог једињења био десет пута већи (3,5%). Евидентно је да је смрзнути фламбирани тартуф био одличан носач ове ароматичне компоненте у сиру. Код осталих варијанти, заступљеност овог једињења је била приближна (0,46-0,60%). Што се тиче садржаја алдехида у сиревима од 90 дана, најзаступљенија су били 2-метил-бутанал, 3-метил-бутанал, ацеталдехид и 2-метил-пропанал. На основу садржаја ових једињења, може се рећи да се смрзнути тартуф може успешно применити, при чему је садржај ароматичних алдехида на знатно вишем нивоу у односу на све остале варијанте сирева. Садржај ових алдехида је детектован и у контролном сиру, али на најнижем нивоу у односу на остале варијанте сирева. Најзаступљенија једињења у експерименталним сиревима су била 2-метил-бутанал и 3-метил-бутанал, чији се садржај у сиревима са свежим фламбираним тартуфима кретао од 7,1-7,8% и смрзнутим фламбираним тартуфима од 8,9-9,6%. Код варијанти сирева са аутоклавираним сиревима и сиревима са вештачком аромом, садржај ових једињења је био знатно нижи и кретао се од 0,3-1,8% за 2-метил-бутанал и 1,4-2,4% за 3-метил-бутанал. Ова једињења су носиоци мириса на какао бадем и лешник и дају пријатан мирис производу. Што се тиче присуства алкохола, резултати су показали да су варијанте сирева са фламбираним тартуфима показале већи садржај алкохола у односу на све остале варијанте сирева, осим у садржају етанола. Алкохолна једињења која су важна за арому тартуфа, а која се јављују у сиревима су 2-бутанол, 2-метил-бутанол и 1-октен-3-ол. Сва три једињења су највише заступљена код сирева са фламбираним тартуфима, при чему је 2-бутанол био заступљенији код сира са смрзнутим фламбираним тартуфом и износио 0,41%, а код сира са свежим 0,32%. За обе врсте сира је утврђено да је садржај 2-метил-бутанола био приближан и износио 0,2% у сиру са свежим тартуфом и 0,1% за сир са смрзнутим тартуфом. Важно ароматично једињење за арому тартуфа је и 1-октен-3-ол, који није детектован ни у једној варијанти сира, осим код сира са свежим фламбираним (0,32%) и сира са смрзнутим фламбираним тартуфом 0,22%. Код сирева са вештачком аромом није детектовано ни једно од наведених једињења. Једињења 2-метил-бутанол и 1-октен-3-ол имају пријатан мирис, при чему прво има мирис на сир, а друго на бели лук и печурке. Кандидаткиња је сумирала и истакла да су сиреви са свежим и смрзнутим фламбираним тартуфима имали већи удео свих једињења која су

важни носиоци ароме тартуфа, при чему је сир са свежим тартуфом имао незнатно већи садржај ових једињења, чиме је потврђена хипотеза, да је могуће наћи третман чувања тартуфа на дужи рок, а да се његовом применом у производњи сирева добије висок квалитет сира. У последњем потпоглављу **Сензорна анализа сирева** кандидаткиња је показала да постоји утицај додавања различито припремљених тартуфа на мирис, а посебно на укус сирева, након 3 месеца зрења. Најниже оцене у погледу мириса и укуса су имали сиреви произведени уз додатак вештачке ароме што је потврдила најнижа оцена 79,7% од максимално могућег квалитета. Такође, поред контролног сира, најбоље оцењени сиреви након зрења су сиреви произведени са тартуфима који су припремљени поступком фламбирања. Овакви резултати су и очекивани с обзиром да такав начин припреме у највећој мери задржава природна својства тартуфа. Ово је у складу и са резултатима испитивања протеолитичких промена у којима је установљен већи коефицијент зрелости. Сиреви са тартуфима додати након фламбирања (СВФ) или након чувања у смрзнутом стању а потом фламбирани (СМФ) су се одликовали са 98,08% и 95,41% од максимално могућег квалитета што их сврстава у групу одличних сирева.

Закључци- У закључном разматрању кандидаткиња је сумирала резултате рада у следеће ставове:

Изолацијом микроорганизама са површине и унутрашњости аскокарпа црног тартуфа *Tuber aestivum*, добијено је укупно 35 бактеријска изолата; 5 актиномицета; 4 изолата гљива; 7 изолата квасаца. АПИ тестовима је утврђено да су у највећем броју присутне врсте из рода *Bacillus* 20, затим по 3 изолата из родова *Pseudomonas* и *Aeromonas*, по 2 изолата *Staphylococcus* sp. и *Brevibacillus brevis*, по 1 из родова *Arthrobacter* и *Microbacterium*, као и квасци: *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus humicalus* и *Kloeckera apiculata*. Анализом секвенцирања је потврђено да највећи број бактеријских изолата (19) припада врстама рода *Bacillus*, од којих је 18 изоловано са површине и 1 из унутрашњости аскокарпа. Остали сојеви се могу сврстати у 6 родова: *Pseudomonas* sp. (4), *Staphylococcus* sp. (3), *Brevibacterium* sp. (2), *Microbacterium* sp. (1), *Enterococcus* sp. (1) и *Arthrobacter* sp. (1). Изолати квасаца су на основу 18s rRNK, идентификовани као *Cryptococcus*, *Debaromyces hanseinii*, *Candida fermentati* и *Rhodotorula mucilaginosa*.

Идентификацијом актиномицета и гљива, добијено је да 2 изолата актиномицета припадају роду *Actinomyces*, а три *Streptomyces* и 4 различита изолата гљива: *Penicillium notatum*, *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. и *Trichoderma* sp.

Праћењем промена садржаја испарљивих једињења, свежег тартуфа и тартуфа који су подвргнути различитим режимима замрзавања, укупно је детектовано 57 испарљивих једињења, од којих је 26 издвојено као значајнија: једињења која садрже сумпор (5), алдехиди (7), кетони (4), алкохоли (6) и фурани (4). При свим режимима замрзавања је утврђено присуство сумпорних једињења метантиола, диметил-сулфида (ДМС), диметил-дисулфида (ДМДС), диметил-трисулфида (ДМТС), при чему је у нултом дану садржај ДМС био највећи. При свим режимима замрзавања, промене у садржају сумпорних једињења су биле веома сличне, при чему је садржај метантиола код режима -20°C био највећи у односу на остала сумпорна једињења. Као главни испарљиви алдехиди детектовани су: ацеталдехид, 2-метил-пропанал, 2-метил-бутанал и 3-метил-бутанал. Процес замрзавања је утицао на смањење концентрације ацеталдехида, док се садржај 2-метил-пропанала се није значајно мењао. Током чувања, концентрација 2-метил-бутанала је показала тренд раста, осим код узорка третираног у течном азоту и чуваног на -20°C у 90-ом дану. Од кетона праћен је садржај: 2-бутанона, 2,3-бутандиона, 2,3-пентандиона, 3-октанона. Показало се да је садржај 2-бутанона

вишеструко већи након замрзавања и чувања на -20°C , а садржај 3-октанона нешто већи код лиофилизованог тартуфа, док код осталих кетона није било значајних разлика. У погледу садржаја алкохола, праћено је 6 једињења током 90 дана чувања: етанол, 2-бутанол, 1-пропанол, 2-метил-1-пропанол, 2-метил 1-бутанол, 1-октен-3-ол. Утврђено је највеће присуство 2-бутанола, при чему режими замрзавања нису имали утицаја на садржај 2- бутанола у нултом дану, а у 90. дану код смрзнутих тартуфа, садржај је био већи него у свежем тартуфу. Класу деривата фурана представљали су: фуран, 3-метил-фуран, 2-пентил-фуран и 2-фуран-метанол. На основу добијених резултата, режим замрзавања на -20°C је изабран за даљи експеримент.

Микробиолошки статус третираних тартуфа за примену у производњи сирева је показао да поступак деконтаминације аутоклавирањем даје бољи ефекат, где је постигнута потпуна стерилност, док је поступак фламбирања показао такође веома добар učinak (10^3 cfu/g). У оквиру укупног броја мезофилних бактерија доминантне су биле врсте рода *Bacillus*, које су након фламбирања биле на нивоу 10^2 cfu/g. Ентеробактерије и колиформне бактерије нису детектоване у фламбираним тартуфу, а број сулфиторедукујућих кластридија је пао на 11 cfu/g.

На основу садржаја ароматичних једињења у тартуфима, након фламбирања и аутоклавирања, утврђено је да је фламбирање поступак којим се боље чувају ароматичне материје у тартуфу. Изутетак се показао код садржаја ДМС, ацет-алдехида, хексанала, 2-метил-1-пропанола и 2,3-бутандиона.

Микробиолошком анализом сирева у свим узорцима није детектовано присуство ентеробактерија током 90 дана зрења, а одсуство спорогених сулфиторедукујућих је показало да је поступак фламбирања правилно спроведен. На самом почетку и током зрења сирева се показало да су стартер културе и аутохтона пробиотска култура *Lb. plantarum* 564 у свим варијантама сирева биле присутне у високом броју 8-9 log јединица. Варијанте са фламбираним свежим и фламбираним смрзнутим тартуфима имале су од почетка до краја зрења број од 9 log јединица, што је било за 1 log јединицу више од свих осталих варијанти сирева.

На основу хемијског састава утврђено је да су сиреви припадали групи пуномасних, тврдих сирева. Додавање тартуфа није утицало на хемијски састав сирева. Установљена је значајна разлика у коефицијенту зрелости између испитиваних сирева. Контролни сир као и сиреви произведени са аутоклавираним тартуфима, било пре или након замрзавања, су имали коефицијент зрелости у интервалу од 14,31-16,67%. Сиреви произведени са фламбираним тартуфима, без обзира да ли су свежи или смрзавани, су показали значајно већи коефицијет зрелости који се кретао у интервал 24,63-25,53%. Електрофоретским испитивањем протеолизе сирева утврђена је израженија протеолиза код варијанти сирева који су произведени са фламбираним тартуфима.

У погледу састава ароматичних једињења сирева, детектовано је присуство сумпорних једињења, алдехида, кетона и алкохола. Анализом сумпорних једињења је утврђено да у свим варијантама сирева без додатка вештачке ароме није детектовано присуство сумпорних једињења. Анализом релативног удела кетона, утврђено је да су најзасупљенији код варијанти сирева са свежим и замрзнутим фламбираним тартуфима (СВФ и СМФ). Садржај једињења 2,3-бутандиона у сиревима са фламбираним тартуфима је био највећи (СВФ=24,3% и СМФ=19,6%). Једињење 2-бутанон је имало значајну улогу у саставу кетона у свим варијантама сирева, при чему је у контролном сиру садржај овог једињења је био најнижи (0,35%), док је у сиру са смрзнутим фламбираним тартуфом, садржај овог једињења био десет пута већи (3,5%). Такође, за кетоне 2-пентанон и 2-хептанон је утврђено највеће присуство у узорцима сирева са фламбираним тартуфима. Што се тиче садржаја алдехида у сиревима од 90 дана,

најзаступљенија су били 2-метил-бутанал, 3-метил-бутанал, ацеталдехид и 2-метил-пропанал. Утврђен је највећи релативни удео у варијантама сирева са фламбираним тартуфима, при чему је код сира са смрзнутим фламбираним тартуфом удео ових једињења већи у односу на сир са свежим фламбираним тартуфом. Најзаступљенији алдехиди у експерименталним сиревима су били 2-метил-бутанал и 3-метил-бутанал, чији се садржај у сиревима са свежим кретао од 7,1-7,8% и смрзнутим фламбираним тартуфима од 8,9-9,6%. Алкохолна једињења која су важна за арому тартуфа, а која се појављују у сиревима су 2-бутанол, 2-метил-бутанол и 1-октен-3-ол. Сва три једињења су највише заступљена код сирева са фламбираним тартуфима, при чему је 2-бутанол био заступљенији код сира са смрзнутим фламбираним тартуфом и износио 0,41%, а код сира са свежим 0,32%. Код сирева са вештачком аромом није детектовано ни једно од наведених једињења

Сензорном оценом сирева је утврђено да утицај додавања различито припремљених тартуфа је запажен на мирису, а посебно укусу сирева, након 90 дана зрења. Осим контролног сира, најбоље оцењени су сиреви са свежим тартуфима додати након фламбирања (СВФ) и након чувања у смрзнутом стању (СМФ). Ови сиреви су се одликовали са 98,08% и 95,41% од максимално могућег квалитета што их сврстава у групу одличних сирева. Најниже оцене у погледу мириса и укуса је имао сир произведен уз додатак вештачке ароме што је резултирало најнижом оценом 79,7% од максимално могућег квалитета.

Литература- У дисертацији је на правилан начин цитирано 303 литературних извора који у потпуности одговарају проблематици која је изучавана.

Прилог – У прилогу рада је детаљније представљен део резултата и састоји се од 34 табеле.

3 Закључак и предлог

Докторска дисертација Душанке Пауновић, мастер инжењера технологије, под насловом „Тартуф (*Tuber* sp.): микрофлора, ароматична једињења и примена у производњи сира“, представља оригиналну, самосталну и заокружену научно-истраживачку целину.

Програмом ове дисертације обухваћена су испитивања микрофлоре црног летњег тартуфа *Tuber aestivum*, проналажење оптималног начина замрзавања и инкорпорације тартуфа у сир без додавања вештачке ароме, обogaћеног потенцијалним пробиотиком *Lactobacillus plantarum* 564 у циљу добијања иновативног природног прехранбеног производа.

Примењујући адекватне, савремене методе и технике, Душанка Пауновић 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 такође добро изведени и у сагласности са добијеним резултатима и вођеном дискусијом.

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

Оцењујемо да ова дисертација представља заокружену научну целину проучавања микрофлоре тартуфа, проналажења начина замрзавања да се очува природна арома тартуфа током чувања, као и производња и карактеризација сирева са

додатком свежих и замрзнутих тартуфа и аутохтоних потенцијалних пробиотских бактерија, високог сензорног квалитета, који је комплетно пореклом из Србије.

Сматрамо да је проблематика коју је докторанткиња обрадила, експериментално испитала и обрадила 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 инжењера Душанке Пауновић под насловом „*Тартуф (Tuber sp.): микрофлора, ароматична једињења и примена у производњи сира*“ и позове кандидаткињу да је јавно брани.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Београд,
27. 05. 2021.

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

Др Миомир Никшић, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област Технолошка микробиологија

Др Веле Тешевић, редовни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област Органска хемија

Др Јелена Миочиновић, 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

Прилог

Објављен рад Душанке Пауновић мастер инж. у научном часопису на SCI листи:

Radulović, Z., Miočinović, J., Mirković, N., Mirković, M., **Paunović, D.**, Ivanović, M., Seratlić, S. 2017: Survival of spray-dried and free-cells of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 564 in soft goat cheese. *Animal Science Journal*, 88, 1849-1854. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/asj.12802>

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 „*Тартуф (Tuber sp.): микрофлора, ароматична једињења и примена у производњи сира*“, аутора Душанке Пауновић, 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