

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

дипл инж Љубиша Шарић

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовao комисију Комисија је именована на 73. редовној седници Наставно-научног већа Технолошког факултета, 05.06.2015. године.</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>Председник: др Спасенија Милановић, редовни професор, Прехрамбено инжењерство, 04.05.2004., Технолошки факултет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Драгољуб Цветковић, ванредни професор, Биотехнологија, 23.02.2015., Технолошки факултет у Новом Саду; ментор</p> <p>Члан: др Мирјана Антов, редовни професор, Биотехнологија, 23.05.2011., Технолошки факултет у Новом Саду;</p> <p>Члан: др Анамарија Мандић, научни саветник, Прехрамбено инжењерство, 25.09.2013., Научни институт за прехрамбене технологије у Новом Саду;</p> <p>Члан: др Драгиша Савић, редовни професор, Прехрамбена технологија и биотехнологија, 31.03.2008., Технолошки факултет у Лесковцу.</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Љубиша, Ћиро, Шарић</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 24.10.1979., Бањалука, Република Српска, БиХ</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Технолошки факултет у Новом Саду, Конзервисана храна, Дипломирани инжењер технологије</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2007. Прехрамбено-биотехнолошке науке</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -</p>
<p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ: „АНТИБАКТЕРИЈСКА АКТИВНОСТ МЛЕКА МАГАРИЦЕ БАЛКАНСKE РАСЕ“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.

Докторска дисертација дипл инж Љубише Шарића је веома прегледно и јасно изложена у шест поглавља:

Увод (стр. 1-4),

Преглед литературе (стр. 5-44),

Материјали и метод рада (стр. 45-54),

Резултати и дискусија (стр. 55-178),

Закључак (стр. 179-183),

Литература (стр. 184-199).

Дисертација је написана на 199 страна А4 формата, са 43 слике и 75 табела, цитирано је 208 литературна навода, а осим тога су дате и кључне документацијске информације са кратким изводом на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. поглавље (Увод) – Кандидат у Уводу указује на чињеницу да се савремена научна истраживања окрећу испитивању традиционалних производа, чиме је и млеко магарице у скороје време доспело у фокус научних истраживања. Кандидат наводи да је млеко магарице прву специфицирану комерцијалну намену, изузимајући примену у козметичкој индустрији, нашло као замена за мајчино млеко код одојчади и деце осетљиве на кравље протеине, а затим указује на његову функционалност и потенцијални значај за здравље конзумента. У складу са тим, дат је преглед научно доказаних лековитих својстава млека магарице која укључују превентивно деловање на појаву атеросклерозе, антиупално, антипролиферативно, антиканцерогено и антивирално деловање.

Млеку магарице се такође приписује и снажан антимикуробни потенцијал који је до данас остао најмање истражени аспеката његове функционалности. Кандидат констатује да постоји свега неколико доступних научних извештаја о његовим антибактеријским својствима која се приписују високој концентрацији лизозима, уз остављање простора и за индивидуално и/или синергистичко деловање других компонената млека, обзиром на комплексност овог медијума. Кандидат даље истиче да су литературни подаци о функционалности, а поготову о микробиологији и евентуалној антимикуробној активности млека магарице балканске расе која егзистира на подручју Србије и околних балканских земаља, лимитирани у још већој мери. У Уводу су дати и подаци о бројности ове расе у Србији, као и местима њиховог узгоја. Наводи се да је млеко магарице у Србији већ нашло примену у производњи сира и козметичких препарата, а забележен је и раст потражње за овим млеком у терапеутске сврхе. Млеко магарице се на нашим просторима традиционално користи за третман астме и бронхитиса, али га користе и потрошачи који желе да свој имуни систем подигну на виши ниво. Кандидат наводи да је уобичајено да се млеко магарице конзумира без претходне топлотне обраде како се под дејством топлоте не би деградирале нутритивно вредне, термолабилне супстанце. Међутим, та пракса покреће низ питања која се односе на здравствену безбедност конзумирања млека у сировом стању.

Како се наводи у Уводу, предмети истраживања ове докторске дисертације су били утврђивање микробиолошког квалитета сировог млека магарице балканске расе, као и испитивање његове антибактеријске активности према одабраним сојевима *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и *Klebsiella pneumoniae*. Према кандидату, потврђена антибактеријска активност млека ове расе била би потврда да се млеко магарице, уз испуњење свих хигијенских стандарда током muže, манипулације и складиштења, може безбедно конзумирати без претходне топлотне обраде. Утврђивањем антибактеријског потенцијала млека магарице балканске расе отворила би се могућност и његове примене као функционалног састојка у разним врстама прехранбених производа. Даље се наводи да је у циљу утврђивања главних носилаца антибактеријског дејства, као и самог модела антибактеријског деловања, у одабраним узорцима овог млека намењеним извођењу антибактеријских испитивања извршено одређивање садржаја антимикуробних протеина - лизозима и лактоферина, као и садржаја калцијума. У узорцима млека магарице за испитивање антибактеријске активности према *S. aureus* и *L. monocytogenes* одређен је и садржај масних киселина са документованом антибактеријском активношћу према Грам позитивним бактеријама - линолне (C_{18:2}), лауринске (C_{12:0}) и олеинске

киселине (C_{18:1}).

2. поглавље (Преглед литературе) – Поглавље Преглед литературе састоји се из шест делова. Кандидат се у првом делу овог поглавља бавио domestikацијом и историјатом магараца, где је навео владајуће теорије о њиховом пореклу и начинима њиховог ширења са афричког на европски континент. Кандидат је дао преглед употребе магараца кроз историју, почевши од старог Египта и античке Грчке, па све до данашњих дана. Кандидат такође наводи да су захваљујући напретку механизације и масовног напуштања руралних подручја од стране људи ови копитари у развијеним земљама изгубили економски значај, тако да је њихов број данас вишеструко смањен.

У другом делу 2. поглавља описане су физичке карактеристике магараца, са акцентом на магарце балканске расе. Кандидат истиче да за разлику од осталих домаћих животиња код магараца постоје много мање разлике између раса, што довољно говори о томе колико се мали значај придавао оплемењивању ових животиња. Кандидат затим даје податке о млечности магарица и наводи да се генетска селекција раса коња и магарица у правцу повећања продукције млека још увек није догодила. Последица тога је постојање великих варијације у погледу приноса млека ових врста, дужине трајања лактације, као и велике индивидуалне варијабилности.

У трећем делу 2. поглавља дат је кратак преглед употребе млека магарице кроз векове, где се наводи да његова примена у козметичке сврхе датира још од римског доба, да би се оно као замена за мајчино млеко користило у Енглеској, Француској и Русији током 17., 18. и 19. века

У четвртм делу 2. поглавља описан је специфичан хемијски састав млека магарице које је у том погледу најсличније кобиљем и хуманом млеку. Кандидат је у овом делу дисертације поредио млеко магарице са млеком других врста у погледу протеинског састава, садржаја масних киселина, угљених хидрата, минерала и витамина.

У петом делу 2. поглавља кандидат наводи изворе контаминације сировог млека апострофирајући површину вимена, површину опреме за мужу и складиштење млека, околни простор и микроорганизме из самог вимена млечне животиње. Кандидат затим износи податке о иницијалној микробиоти сировог млека са посебним освртом на патогене микроорганизме, да би на крају извршио преглед законских регулатива у погледу конзумирања сировог млека, и то посебно европске регулативе ЕС 853/2004.

У последњем делу овог поглавља описана су антимикуробна једињења млека, укључујући лизозим и лактоферин. Представљени су механизми њиховог деловања, основне структурне и функционалне карактеристике, а такође су наведени и микроорганизми, односно групе микроорганизама на које ова једињења делују.

Свако од обрађених питања поткрепљено је бројним литературним наводима, на основу којих је дипл инж Љубиша Шарић био у могућности да правилно анализира и објасни добијене резултате и да их упореди са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици.

3. поглавље (Материјал и метод рада) – Кандидат најпре описује начин прикупљања узорака током 21 месеца трајања експеримента, где је за испитивање микробиолошке слике млека магарице у Специјалном резервату природе „Засавица“ сакупљено укупно 137 узорака млека од 33 различите магарице. Такође се описује начин манипулације узорцима млека у лабораторији Научног института за прехранбене технологије. У наставку су наведене методе за испитивање микробиолошке слике сировог млека магарице, као и методе за праћење промена микробиолошког квалитета збирних узорака сировог млека магарице током 6 дана складиштења на +4 °С. Кандидат потом наводи тест микроорганизме који су кориштени за испитивање антибактеријске активности млека магарице, као и начин припреме култура тест микроорганизама. Детаљно и јасно је описан поступак вештачке контаминације узорака млека магарице, као и тест за испитивање антибактеријске активности. Затим је представљен начин испитивања утицаја концентрације калцијума на антибактеријску активност млека магарице према тестираним сојевима *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, путем додавања CaCl₂ и EDTA у одабране узорке овог млека. Назначене су и микробиолошке подлоге које су кориштене у ту сврху. Кандидат је навео и методе за испитивање рН вредности, одређивање садржаја лизозима и лактоферина (метода електрофоретског раздвајања протеина на чипу), одређивање садржаја калцијума (метода атомске апсорпционе спектрофотометрије) и одређивање садржаја масних киселина у одабраним узорцима млека магарице (метода гасне хроматографије са масеном детекцијом). Резултати свих мерења су изражени као средње вредности три понављања са наведеним стандардним девијацијама. Добијени резултати су на адекватан начин статистички

обрађени анализом варијансе помоћу Данкановог теста за поређење вишеструких средњих вредности коришћењем програмског пакета STATISTICA 10.

4. поглавље (Резултати и дискусија) – Резултати испитивања предвиђени задацима докторске дисертације као и њихово тумачење су систематизовано и јасно приказани на 39 слика и у 71 табели, а поглавље је подељено на 3 целине. Кандидат је прво приказао резултате испитивања микробиолошке слике 137 појединачних узорака сировог млека магарице, као и резултате праћења промена микробиолошког квалитета збирних узорака сировог млека магарице током 6 дана складиштења на +4 °С. У другом делу овог поглавља представљени су резултати испитивања антибактеријске активности одабраних узорака млека магарице према радним сојевима *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* и *K. pneumonia* на +9, +15 и +38 °С. Резултати су табеларно приказани у виду промене броја тестираних бактерија у узорцима млека магарице са различитим нивоима контаминације (10^2 , 10^3 и 10^4 cfu/ml) током 4 дана трајања огледа на +9 и +15 °С, односно у узорцима са нивоом контаминације од 10^2 cfu/ml током 8 сати трајања огледа на +38 °С. У овом делу 4. поглавља су такође приказани садржаји лизозима, лактоферина и калцијума у узорцима млека магарице коришћеним за испитивање антибактеријске активности према тестираним бактеријама на +9, +15 и +38 °С. Такође су приказани и резултати мерења рН вредности узорака млека магарице који су кориштени за испитивање антибактеријске активности према радним сојевима *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у огледима на +38 °С. Кандидат је у овом делу докторске дисертације представио резултате одређивања броја виабилних ћелија радних култура *E. coli*, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у одабраним узорцима млека магарице са додатим CaCl_2 и EDTA након 8 сати инкубирања на +38 °С. Кандидат је у другом делу 4. поглавља приказао резултате испитивања утицаја нивоа контаминације и температуре инкубирања на антибактеријска својства млека магарице графичким приказом просечних вредности броја тестираних бактерија у испитаним узорцима млека магарице и хранљивом бујону за различите нивое контаминације (10^2 , 10^3 и 10^4 cfu/ml) током инкубирања на +9 и +15 °С. Такође су графички приказане и просечне вредности броја *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, односно *E. coli* ATCC 10536 и *E. coli* ATCC 8739 у тестираним узорцима млека магарице и хранљивом бујону за ниво контаминације од 10^2 cfu/ml, током инкубирања на +38 °С. У трећем делу 4. поглавља дискутовани су добијени резултати и разматрани механизми антибактеријског деловања млека магарице на Грам позитивне и Грам негативне бактерије. Кандидат је у овом делу 4. поглавља у оквиру разматрања механизма антибактеријског деловања млека магарице на Грам позитивне бактерије приказао резултате одређивања садржаја масних киселина у узорцима млека магарице који су кориштени за испитивање антибактеријске активности према *S. aureus* и *L. monocytogenes* на +38 °С, где је акценат ставио на масне киселине са документованом антибактеријском активношћу према Грам позитивним бактеријама.

У обављеној анализи резултата кандидат је испољио велико теоретско знање, вешто је користио бројне податке из цитиране литературе упоређујући их са резултатима сопствених истраживања, а уочене појаве успешно је објаснио у духу савремених истраживања, да би на крају изнео и валидне закључке.

5. поглавље (Закључак) - Закључци су веома добро изведени из добијених резултата и њихове дискусије, те се могу сматрати поузданим.

6. поглавље (Литература) – Литературни наводи обухватају све савремене аспекте везане за микробиологију и хемију млека, антимикробну активност лизозима и лактоферина и функционалност млека магарице, а цитирани су на умешан и правилан начин.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01. јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање,

таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

M 21

Šarić, Lj., Šarić, B., Mandić, A., Torbica, A., Tomić, J., Cvetković, D., Okanović, Đ. (2012). Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. *International Dairy Journal*, 25, 142-146.

M22

Ljubiša Ć. Šarić, Bojana M. Šarić, Anamarija I. Mandić, Žarko S. Kevrešan, Bojana B. Ikonić, Snežana Ž. Kravić, Dubravka J. Jambrec (2014). Role of calcium content in antibacterial activity of donkeys' milk toward *E. coli*. *European Food Research and Technology*, 239, 1031–1039.

M23

Ljubiša Šarić, Bojana Šarić, Anamarija Mandić, Jelena Tomić, Aleksandra Torbica, Nataša Nedeljković, Bojana Ikonić (2014). Antibacterial activity of donkey milk against *Salmonella*. *Agro FOOD Industry Hi Tech*, 25 (5), 30–34.

M51

Ljubiša Ć. Šarić, Bojana M. Šarić, Snežana T. Kravić, Dragana V. Plavšić, Ivan Lj. Milovanović, Jasmina M. Gubić, Nataša M. Nedeljković (2014). Antibacterial activity of Domestic Balkan donkey milk toward *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food and Feed Research*, 41 (1), 47–54.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Присуство *L. monocytogenes* и *Salmonella* spp. као критеријума безбедности није утврђено ни у једном од 137 испитаних узорка сировог млека магарице, док је број *E. coli*, колиформних бактерија, Enterobacteriaceae, квасаца и плесни и суспектног *B. cereus* био испод границе детекције методе. Укупан број микроорганизама у сировом млеку магарице се налазио у интервалу од $0,8 \pm 0,1$ до $4,6 \pm 0,02$ log cfu/ml, а број бактерија млечне киселине у опсегу од $0,3 \pm 0,0$ до $2,54 \pm 0,01$ log cfu/ml. Бактерије млечне киселине нису детектоване у четири узорка овог млека. Аеробне спорогене бактерије су у броју од 1,08 до 1,39 log cfu/ml биле присутне у шест од 137 испитаних узорка сировог млека магарице, док су само два узорка била позитивна на сулфиторедукујуће клостридије. У оба случаја њихов број је био мањи од 1,0 log cfu/ml. У 37,23% испитаних узорка сировог млека магарице регистровано је присуство коагулаза позитивних стафилокока чији се број кретао у интервалу од $1,0 \pm 0,0$ до $2,62 \pm 0,02$ log cfu/ml.

Збирни узорци сировог млека магарице узорковани 2011. године су након три дана складиштења на $+4$ °C задовољавали захтеве европске регулативе EC 853/2004 за сирово млеко намењено директном конзумирању, за разлику од збирних узорка млека магарице из 2012. и 2013. године који су током свих 6 дана складиштења на $+4$ °C били у складу са овом регулативом.

Сви испитани узорци сировог млека магарице балканске расе су задовољавали захтеве европских регулатива 92/46/ЕЕС и EC 853/2004 и са микробиолошког аспекта су у потпуности били безбедни за директно конзумирање без претходне топлотне обраде. Резултати добијени у овој докторској дисертацији су указали на то да је за млеко магарице намењено директном конзумирању неопходно установити нове микробиолошке критеријуме прихватљивости или евентуално преузети критеријуме дефинисане за сирово кравље млеко.

Сирово млеко магарице балканске расе је показало различиту антибактеријску активност према Грам позитивним и Грам негативним бактеријским сојевима тестираним у оквиру ове докторске дисертације. Антибактеријска активност сировог млека магарице према *L. monocytogenes* и *S. aureus* се на свим радним температурама састојала од продужења лаг фазе и инхибирања бактеријског раста, док се у случају *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536 и *K. pneumoniae* она огледала у редуцији њиховог иницијалног броја и/или продужењу лаг фазе. Интензитет те редуције и време трајања лаг фазе су били одређени експерименталним условима и природом самих узорка млека.

Интензитет антибактеријске активности млека магарице балканске расе према свим испитаним бактеријама је био условљен нивоом контаминације узорка млека тестираним патогеном и температуром инкубирања.

Код већине испитаних узорка млека магарице повећање нивоа контаминације је значило скраћење лаг фазе и повећање броја тестираних патогена детектованих на крају инкубирања. Сходно томе, са повећањем нивоа контаминације у огледима са *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E.*

coli ATCC 10536 и *K. pneumoniae*, смањивао се број узорака у којима су тестиране бактерије по завршетку инкубирања биле испод границе детекције.

Уколико се посматрају просечне вредности промене броја тестираних микроорганизама у млеку магарице током трајања огледа, закључује се да је температура инкубирања од +15 °C била генерално повољнија за активност антибактеријских супстанци у млеку магарице према свим тестираним патогенима у поређењу са температуром од +9 °C. Међутим, антибактеријски потенцијал узорака млека магарице на +15 °C био је лимитиран бржим умножавањем испитаних бактерија на овој температури инкубирања. То је посебно важило за узорке са већим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml) у којима је после извесног времена дошло до слабљења антибактеријске активности и регистравања већег броја тестираних бактерија на крају инкубирања у односу на огледе спроведене на +9 °C. Према томе, утицај температуре инкубирања на антибактеријску активност млека магарице према тестираним бактеријским сојевима није се могао посматрати одвојено од нивоа контаминације испитаним бактеријама.

Резултати ове докторске дисертације су указали на калцијум-зависну природу антибактеријске активности сировог млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и оба тестирана соја *E. coli*. У складу са тим, по завршетку инкубирања највећи степен редукције њихових бактеријских ћелија забележен је у узорцима млека магарице са највећим концентрацијама овог метала. Насупрот томе, у овој докторској дисертацији није утврђена веза између антибактеријске активности млека магарице према *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *K. pneumoniae* и садржаја калцијума.

Различити сојеви исте бактеријске врсте, односно различите врсте истог рода су у овој докторској дисертацији показале различиту осетљивост на антибактеријско деловање млека магарице. Тако се *S. Typhimurium* на температурама инкубирања од +9 и +38 °C, као и на +15 °C у узорцима са најнижим нивоом контаминације (10^2 cfu/ml), показала осетљивијом на антибактеријско деловање млека магарице у односу на *S. Enteritidis*, што је био случај и са *E. coli* ATCC 8739 у поређењу са *E. coli* ATCC 10536. Међутим, у узорцима млека са већим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml) у огледима на +15 °C регистрован је обрнут случај. Разлог томе је вероватно брже умножавање *E. coli* ATCC 8739 и *S. Typhimurium* на +15 °C у односу на *E. coli* ATCC 10536 и *S. Enteritidis*. Већа брзина умножавања поменутих бактеријских сојева, потпомогнута релативно великим иницијалним бројем, вероватно је проузроковала бржу потрошњу антибактеријског потенцијала тестираних узорака млека магарице на овој температури, па је након четири дана инкубирања у узорцима млека магарице углавном бележен већи број *S. Typhimurium* и *E. coli* ATCC 8739 у односу на *S. Enteritidis* и *E. coli* ATCC 10536, иако то није био случај након 24, 48 и/или 72 сата инкубирања.

Зависност антибактеријске активности тестираних узорака млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536, *L. monocytogenes* и *S. aureus* од садржаја лактоферина у овој докторској дисертацији није доказана. Изузетак би могао бити оглед са *E. coli* ATCC 8739 на +15 °C, где су узорци са најснажнијим антибактеријским потенцијалом поред великог садржаја калцијума и лизозима имали и највећи садржај лактоферина. У овом случају се евентуални допринос овог ензима укупној антибактеријској активности млека магарице не може искључити. Са друге стране, антибактеријска активност испитаних узорака млека магарице према *K. pneumoniae* је била условљена концентрацијом лактоферина.

Стриктна корелација антибактеријске активности узорака млека магарице и садржаја лизозима такође није утврђена у овој докторској дисертацији. Међутим, највећи степен инхибиције раста *L. monocytogenes* и *S. aureus* у огледу на +15 °C, забележен је у узорцима са садржајем лизозима већим од 3 g/l. У огледу са *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *E. coli* ATCC 8739 на +15 °C најснажнију антибактеријску активност показали су узорци млека који су осим великог садржаја калцијума имали и велики садржај лизозима. То је био случај и са *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 у огледима на +9 °C. Због тога је под овим експерименталним условима било тешко дати предност утицају садржаја калцијума на антибактеријску активност млека магарице у односу на директан утицај саме концентрације лизозима. Ипак, чињеница је да је узорак са најмањим садржајем калцијума (466,10 mg/l) уједно показао и најслабије антибактеријско дејство према *E. coli* ATCC 8739. У огледима на +15 °C при већим нивоима контаминације (10^3 и 10^4 cfu/ml), узорци са највећим садржајем лизозима су показали и најснажнију антибактеријску активност према *K. pneumoniae*.

Лизозим је највероватније главни носилац антибактеријске активности млека магарице балканске расе јер је у односу на други антимикуробни агенс – лактоферин у тестираним узорцима млека магарице детектован у вишеструко већој концентрацији. Обзиром на утврђену калцијум-зависну

природу антибактеријске активности тестираних узорака млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ATCC 8739 и *E. coli* ATCC 10536 врло је могуће да је детектована антибактеријска активност последица способности лизозима млека магарице да везивањем јона калцијума мења своју структуру (формира линеарне протофиламенте) и на тај начин унапређује антибактеријску активност према поменутиим Грам негативним бактеријама. Одсуство зависности антибактеријске активности млека магарице према *K. pneumoniae* од садржаја калцијума у тестираном млеку упућује на другачији механизам антибактеријског деловања млека магарице према овом клиничком изолату у односу на друге тестиране Грам негативне бактерије. У овом случају би основни механизам антибактеријског деловања млека магарице могао бити синергизам лизозима и лактоферина. Слаба антибактеријска активност млека магарице према Грам позитивним *L. monocytogenes* и *S. aureus* забележена на температури инкубирања од +9 °C могла би да указује на ензиматско антибактеријско деловање лизозима према овим патогеним бактеријама. Известан допринос антибактеријској активности млека магарице балканске расе према *L. monocytogenes* и *S. aureus* могле би да дају и масне киселине са документованим антибактеријским дејством према Грам позитивним бактеријама (линолна, лауринска и олеинска киселина), које су у анализираним узорцима млека магарице у збиру чиниле од 40,3 до 54,7% од укупних масних киселина.

Антибактеријска активност млека магарице балканске расе утврђена у овој докторској дисертацији, уз добру микробиолошку слику узорака сировог и складишеног млека, представља потпору становишту да се млеко магарице може безбедно конзумирати без претходне топлотне обраде. Такође, резултати испитивања антибактеријске активности сировог млека магарице балканске расе према клиничком изолату *K. pneumoniae* упућују на могућност његове примене у лечењу пнеумонија плућа. поред тога, резултати испитивања антибактеријске активности су показали да антибактеријски потенцијал узорака сировог млека магарице није неограничен, тако да је неопходно испунити све хигијенске стандарде током muže, манипулације и складиштења овог млека. Утврђени антибактеријски потенцијал млека магарице балканске расе отвара могућност његове примене као функционалног састојка у формулацији разних врста прехранбених производа. Такође, подаци о микробиолошком квалитету сировог млека магарице и његовом антибактеријском деловању у великој мери могу допринети бољој процени ризика и анализи биолошких опасности приликом увођења *HACCP* система, који би допринео унапређењу производње млека магарице високог квалитета и безбедности производа.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Добијени резултати су проистекли из веома обимних, оригинално постављених лабораторијских испитивања микробиолошког квалитета и антибактеријске активности сировог млека магарице балканске расе према одабраним Грам позитивним и Грам негативним бактеријским сојевима. Резултати ових истраживања су систематично, јасно и прегледно приказани и дискутовани. Тумачење резултата засновано је на најновијим доступним научним сазнањима из области микробиолошког квалитета млека магарице и антибактеријских својстава лизозима и лактоферина, Тако да се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

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

Дисертација је у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме, а у односу на постављене циљеве урађена су и шира испитивања.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци.

У дисертацији дипл инж Љубише Шарића су први пут приказани резултати испитивања микробиолошког квалитета сировог млека магарице балканске расе, добијени обрађивањем великог броја појединачних узорка, сакупљаних у временском периоду од 21 месеца. Сви испитани узорци сировог млека магарице балканске расе су задовољавали захтеве европских регулатива 92/46/ЕЕС и ЕС 853/2004 и са микробиолошког аспекта су у потпуности били безбедни за директно конзумирање без претходне топлотне обраде. Збирни узорци сировог млека магарице балканске расе су показали микробиолошку стабилност током складиштења на +4 °С, односно задовољавали су захтеве европске регулативе ЕС 853/2004 за сирово млеко намењено директном конзумирању у периоду од 3 до 6 дана складиштења на +4 °С.

Дисертација дипл инж Љубише Шарића представља оригиналан допринос науци јер је комплексним истраживањем доказано да млеко магарице балканске расе поседује снажан антибактеријски потенцијал, првенствено условљен нивоом контаминације и температуром инкубирања. Како испитани бактеријски сојеви, изузев *K. pneumoniae*, представљају главне бактеријске контаминенте хране, то довијени резултати представљају значајне показатеље могућности примене млека магарице као функционалног састојка у разним врстама прехранбених производа. У овој дисертацији је први пут испитана и доказана антибактеријска активност млека магарице према клиничком изолату *K. pneumoniae*, што указује на потенцијалну могућност његове примене у лечењу пнеумонија плућа. На основу добијених резултата кандидат је претпоставио да је лизозим највероватније главни носилац антибактеријске активности млека магарице балканске расе, обзиром да је у односу на други антимикуробни агенс – лактоферин у тестираним узорцима детектован у вишеструко већој концентрацији.

У дисертацији дипл инж Љубише Шарића је први пут доказана веза између садржаја калцијума у узорцима сировог млека магарице и њихове антибактеријске активности према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *E. coli*. Кандидат је претпоставио да је калцијум-зависна природа антибактеријске активности сировог млека магарице према *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *E. coli* последица специфичне структуре молекула лизозима из млека магарице, односно његове способности да везивањем јона калцијума прелази у линеарне форме, чиме унапређује своју антибактеријску активност према поменутиим Грам негативним бактеријама.

У дисертацији дипл инж Љубише Шарића је изнета претпоставка да би основни механизам

антибактеријског деловања млека магарице према *K. pneumoniae* могао бити синергизам лизозима и лактоферина, обзиром да је доказано да су најјачу антибактеријску активност према овој бактерији испољили узорци са највећим садржајем лактоферина. Кандидат је такође указао на могућност да масне киселине са документованим антибактеријским дејством према Грам позитивним бактеријама (линолна, лауринска и олеинска киселина) дају извештај допринос укупној антибактеријској активности млека магарице балканске расе према *L. monocytogenes* и *S. aureus*, обзиром да су оне у анализираним узорцима млека магарице у збиру чиниле од 40,3 до 54,7% од укупних масних киселина.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Недостаци дисертације нису уочени.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

На основу укупне оцене докторске дисертације дипл. инж. ЉУБИШЕ ШАРИЋА, Комисија са задовољством предлаже да се прихвати ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ и кандидату одобри одбрана.

Нови Сад, 11.07.2015. год.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Спасенија Милановић, ред.проф., председник

др Драгољуб Цветковић, ванредни професор, ментор

др Мирјана Антов, редовни професор, члан

др Анамарија Мандић, научни саветник, члан

др Драгиша Савић, ред. проф., члан

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.