

Наставно-научном већу Технолошког факултета у Лесковцу

Одлуком Наставно-научног већа Технолошког факултета у Лесковцу, Универзитета у Нишу, број 4/33-XI од 21.04.2015. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану урађене докторске дисертације под називом "**Бактерије млечне киселине Пиротског качкаваља**", коју је поднео кандидат мр Небојша Милосављевић. На основу прегледа дисертације подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат мр Небојша Милосављевић је поднео докторску дисертацију са следећим садржајем: *Извод* (на српском и енглеском језику, по 1 страна), *Увод* (2 стране), *Литературни део* (32 стране), *Материјал и методе* (8 страна), *Резултати* (24 стране), *Дискусија* (19 страна), *Закључци* (2 стране), *Литература* (29 страна) и *Биографија* (1 страна).

У **Уводу** је указано на значај истраживања везаних за проблематику која је у докторској дисертацији обрађена. Истакнут је значај промена које су условљене узајамном повезаношћу хемијских промена и микробиолошке активности код зрења Пиротског качкаваља. Објашњен је утицај који током производње сира имају бактерије млечне киселине на синтезу једињења која утичу на формирање специфичне ароме, као и на текстуру и квалитет производа. Формулисани су циљеви рада који се састоје у праћењу промене популације бактерија млечне киселине (БМК) у току зрења Пиротског качкаваља произведеног од овчијег и крављег млека. Поред тога, циљеви рада обухватају и:

- одређивање броја БМК и укупног броја мезофилних бактерија у току зрења Пиротског качкаваља,
- изоловање БМК из узорака Пиротског качкаваља,
- груписање и прелиминарну идентификацију изолата на основу фенотипске карактеризације и FTIR спектроскопије,
- молекуларну идентификацију представника сваке групе изолата до нивоа врсте,
- одређивање промене садржаја лакоиспарљивих компоненти значајних за сензорна својства производа и
- технолошку карактеризацију одређених изолата БМК и одређивање сојева са потенцијалном применом у стартер културама за производњу Пиротског качкаваља.

Теоријски део садржи литературне податке о карактеристикама аутохтоне производње, хемијским, физичким и микробиолошким променама током производње и зрења сирева, посебно Пиротског качкаваља. Поред тога, приказан је пресек доступних литературних података о истраживањима улоге микробиоте у процесима производње и зрења сирева, као и савремени резултати изолације, идентификације и одређивања технолошких својстава БМК.

У поглављу **Материјал и методе** описане су технике и материјали који су примењени у циљу реализације постављених циљева дисертације:

- начин припреме и производње узорака Пиротског качкаваља,
- састав хранљивих подлога које су коришћене у микробиолошким анализама,
- методе за изолацију, фенотипску карактеризацију, FTIR спектроскопску анализу и молекуларну идентификацију изолата БМК,
- услови хемијске анализе (HPLC и GC-MS) узорака качкаваља и
- технолошка и антимикуробна карактеризација издвојених изолата БМК.

Део **Резултати** садржи табеларни и графички приказ резултата докторске дисертације. Експериментални подаци су обрађени применом одговарајућих метода и рачунарских програма. Поглавље је подељено на четири целине. Прва целина обухвата резултате истраживања узорака качкаваља израђеног од овчијег млека, док су у другој целини приказани резултати узорака од крављег млека. За обе целине су приказани резултати:

- одређивања укупног броја мезофилних и термофилних бактерија,
- идентификације изолата БМК из качкаваља,
- промене микробиоте током зрења Пиротског качкаваља,
- HPLC анализе узорака качкаваља и
- GC-MS анализе лакоиспарљивих компоненти Пиротског качкаваља.

У трећој целини приказани су резултати технолошке карактеризације издвојених изолата БМК. Четврта целина овог поглавља садржи резултате антимикуробне активности појединих изолата.

У поглављу **Дискусија** анализирани су добијени резултати и упоређени са литературним подацима о другим врстама сирева. Најзначајнији резултати микробиолошких и хемијских истраживања узорака качкаваља, као и анализа технолошких карактеристика изолата БМК у оквиру ове дисертације су:

- током зрења из узорака качкаваља изоловано је укупно 315 сојева БМК (173 изолата из овчијег и 142 изолата из крављег качкаваља) који су након прелиминарне идентификације и груписања применом физиолошких тестова и FTIR анализе идентификовани молекуларним методама,
- у току зрења, у узорцима качкаваља доминирају родови *Enterococcus* и *Pediococcus*, док су у мањој мери присутне врсте рода *Lactobacillus* и *Streptococcus*, при чему су ентерококе процентуално најбројније БМК (*En. faecium* чини око 50 % укупно идентификоване микробиоте у качкаваљу од овчијег, а 44 % у качкаваљу припремљеног од крављег млека),
- бактерија *En. faecium* је идентификована у свим фазама зрења код качкаваља од овчијег млека (највећу бројност достиже у узорку у почетним фазама зрења - 85% бактеријске популације, док у каснијим фазама зрења удео се смањује до 55% од укупног броја изолованих БМК), док код узорака крављег качкаваља, доминира у почетним фазама зрења (око 90%), док у узорцима након 30 и 60 дана зрења није изолована,
- две врсте педиокока су изоловане из узорака качкаваља (*Pd. acidilactici* и *Pd. pentosaceus*), при чему *Pd. acidilactici* присутан у свим фазама зрења код качкаваља израђеног од овчијег и крављег млека, док је *Pd. pentosaceus* изолован само у узорку након 20 дана зрења овчијег, а након 60 дана зрења крављег качкаваља,
- у узорцима качкаваља у мањој учесталости изоловане су врсте рода *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei/ rhamnosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* и *Lb.*

paracasei) и врста *Streptococcus macedonicus* (једино код качкаваља од овчијег млека на почетку зрења),

- у анализираним узорцима качкаваља утврђено је присуство млечне (доминантна са уделом 0,4-0,6%), јабучне, лимунске и сирћетне киселине, као и пирогрожђане киселине у траговима,
- испарљива једињења одређена у узорцима качкаваља припадају естрима (17), монокарбонским киселинама (8), алкохолима (15), кетонима (9), алдехидима (3), терпенима и угљоводоницима, при чему се током зрења концентрације неких једињења повећавају, док се концентрације других смањују,
- 30 испарљивих једињења је одређено у обе врсте качкаваља, при чему се при зрењу овчијег качкаваља развија више испарљивих компоненти (укупно 55 различитих једињења),
- линеарне засићене слободне масне киселине кратких и средње дугих ланаца су најзаступљеније компоненте у испарљивој фракцији свих узорка качкаваља, док органске киселине и кетони формирају најважније групе по проценту учешћа у свим једињењима (бутерна киселина показује највећу вредност у свим узорцима у свим фазама зрења, док су у опадајућем редоследу заступљене и хексанска, сирћетна и октанска киселина),
- већина издвојених изолата (71%) расте у присуству 0,3% жучних соли, при чему је највећа способност преживљавања утврђена код лактобацила (сви представници овог рода показују раст у присуству жучних соли) и код *En. faecium* (84% популације преживљава),
- коришћење цитрата забележено код 40% од свих селектованих изолата, око 32 % селектованих изолата има способност стварања диацетила, а 12% изолата је имало способност синтезе егзополисахарида,
- антимикробна активност на бактеријске тест културе утврђена је код 8 изолата, при чему је једино изолат *En. faecium* изолован из овчијег качкаваља показао антимикробну активност према свим тест микроорганизмима и
- изолати из Пиротског качкаваља врсте *Lb. casei* представљају добар основ за даље проучавање могућности коришћења у starter културама.

Поглавље **Закључци** сажето приказује најважније резултате и закључке који су добијени истраживањем у оквиру докторске дисертације. На крају текста докторске дисертације дат је списак коришћене литературе (поглавље **Литература**) који обухвата 323 навода.

ЗАКЉУЧАК

Резултати до којих је у својој докторској дисертацији дошао мр Небоша Милосављевић представљају оригинални научни допринос у области Индустријске микробиологије, односно проширивања знања о утицају микроорганизама на процесе производње сирева, посебно Пиротског качкаваља. На основу проучавања у оквиру овог рада, приказан је микробиолошки састав, односно профил промена бактерија млечне киселине у току зрења и, по први пут, приказан састав једињења које учесвују у формирању карактеристичних сензорних својстава Пиротског качкаваља.

Кандидат је део резултата истраживања објавио у водећем међународном часопису (1 рад), часопису националног значаја (1 рад), као и саопштио на научним скуповима међународног (1 штампан у целости, 5 радова штампаних у изводу) и националног (3 рада штампаних у изводу) значаја (списак радова у прилогу Извештаја).

На основу свега наведеног, Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације предлаже Наставно-научном већу Технолошког факултета у Лесковцу да докторску дисертацију мр Небоше Милосављевић под насловом **"Бактерије млечне киселине Пиротског качкаваља"**, прихвати као услов за стицање научног степена доктора техничких наука и кандидата позове на усмену одбрану.

У Београду и Лесковцу,
18.05.2015.

Комисија:

Проф. др Предраг Пуђа, с. р.
Пољопривредни факултет, Земун-Београд

Проф. др Драгиша Савић, с. р.
Технолошки факултет, Лесковац

др Бојана Даниловић, доцент, с. р.
Технолошки факултет, Лесковац

СПИСАК РАДОВА У КОЈИМА ЈЕ ОБЈАВЉЕН ДЕО РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Рад у водећем међународном часопису (M22)

Milosavljević, P. N., Blagojević, D. P., Savić, S. D., & Radulović, S. N. (2012): Application of HS-SPME–GC-MS-derived variables for monitoring ripening-induced changes in cheese volatile compounds, *Dairy Science & Technology*, 92:321-333.

Саопштење са међународног скупа штампано у целости (M33)

Milosavljević, N., Joković, N., Radulović, N., Blagojević, P., Savić, D. (2010): Solid Phase Microextraction in Combination with GC/MS for Analysis of the Major Volatile in “Pirotski kackavalj”, 7th European Congress of Chemical Engineering & 19th International congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2010, (Summaries 5, Systems and Technology, p. 2109; CD-ROM of full texts, 622. pdf) Praha, Czech Republic, 28.08-01.09.2010.

Рад саопштен на скупу међународног значаја, штампан у изводу (M34)

Milosavljević, N., Joković, N., Savić D. (2011): Characterization of the lactic acid bacteria during ripening of Pirot’s kashkaval made of sheep milk, 10th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Abstracts, E 065. 237., Egmond aan Zee, Netherlands.

Milosavljević, N., Joković, N., Danilović, B., Savić, D. (2011): Characterization of lactic acid bacteria in ripened Pirot’s kashkaval, *Microbiologia balkanica 2011 & 7th balkan congress of microbiology & 8th congress of serbian microbiologists*, 25-29 2011, Beograd, Proceedings on CD

Milosavljević, N., Danilović, B., Joković, N., Savić, D. (2012): Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Pirot’s kashkaval, 23rd International ICFMH Symposium, FoodMicro 2012 Global Issues in Food Microbiology, 3-7 September, 2012 Istanbul-Turkey.

Danilović, B., **Milosavljević, N.,** Savić, D., Joković, N., (2013): Biodiversity of lactic acid bacteria in “Pirot’s kackavalj”, cheese produced from ewes’ milk, V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld 2013, Madrid (Spain), 2-4 October 2013, Book of abstracts, p. 169.

Milosavljević, N., Danilović, B., Savić, D. (2014): Lactic acid bacteria in „Pirot’s kachaval”cheese, *Food Micro*, Nantes, France, 1-4.9.2014. Abstract book, p. 209.

Рад у часопису националног значаја (M52)

Милосављевић, Н., Јоковић, Наташа, Радуловић, Н., Благојевић, Полина, Савић, Д. (2010): Испарљива једињења пиротског качкаваља од овчијег млека, *Прех. инд. – Млеко и мл. произ.*, 1-2, 122-126.

Рад саопштен на скупу националног значаја штампан у изводу (M64)

Милосављевић, Н., Јоковић, Н., Савић, Д. (2009): Промена бактеријске популације у току зрења пиротског качкаваља од овчег млека, VIII Симпозијум "Савремене технологије и привредни развој", Зборник извода радова, стр. 71, Технолошки факултет Лесковац, Универзитет у Нишу.

Милосављевић, Н., Наташа Јоковић, Савић, Д. (2011): Промена и карактеризација бактерија млечне киселине у току зрења Пиротског качкаваља припремљеног од крављег млека, IX Симпозијум “Савремене технологије и привредни развој” Технолошки факултет Лесковац, Универзитет у Нишу. Зборник резимеа стр. 59.

Милосављевић, Н., Савић, Д., Даниловић, Б., Јоковић, Н. (2013): Биодиверзитет бактерија млечне киселине пиротског качкаваља од крављег млека, *Микромед 2013*, IX Конгрес микробиолога Србије, 30. мај–01. јун 2013. Београд, књига апстраката.