

## ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

## ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Јелена Круљ, мастер инж. технологије

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>	
1.	Датум и орган који је именовао комисију 12.10.2018. год., Наставно-научно веће Технолошког факултета Нови Сад, Универзитет у Новом Саду
2.	Састав комисије са знаком 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: <ul style="list-style-type: none"> <li>• др Гордана Димић, редовни професор, ужа н.о. Прехрамбено инжењерство, 02.06.2015., Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, председник</li> <li>• др Синиша Марков, редовни професор, ужа н.о. Биотехнологија, 15.10.2012., Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, ментор</li> <li>• др Драгољуб Цветковић, ванредни професор, ужа н.о. Биотехнологија, 25.02.2015., Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, члан</li> <li>• др Марија Бодрож Соларов, научни саветник, ужа н.о. Биотехничке науке - прехрамбено инжењерство, 26.02.2014., Научни институт за прехрамбене технологије у Новом Саду, члан</li> <li>• др Александра Бочаров-Станчић, научни саветник, ужа н.о. Фитопатологија, 25.02.2015. Институт за примену науке у пољопривреди, Београд, члан</li> </ul>
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>	
1.	Име, име једног родитеља, презиме: <b>Јелена (Александар) Круљ</b>
2.	Датум рођења, општина, држава: <b>16.03.1988., Требиње, БиХ</b>
3.	Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив <b>Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, Прехрамбена биотехнологија, Дипломирани инжењер технологије Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, Биотехнологија, Мастер инжењер технологије</b>
4.	Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија <b>2012, Биотехнологија</b>
5.	Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -
6.	Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -
<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>	
<b>Потенцијал биосинтезе афлатоксина <math>B_1</math> у различитим врстама <i>Triticum</i> spp.</b>	

#### IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација маг. инж. Јелене Круљ је веома прегледно и јасно изложена у седам поглавља:

- Увод (стр. 1-3),
- Преглед литературе (стр. 4-40),
- Материјал и методе (стр. 41-61),
- Резултати и дискусија (стр. 62-102),
- Закључци (стр. 103-104),
- Литература (стр. 105-126),
- Прилози (127-133)

Дисертација је написана на 133 нумерисаних страна А4 формата, у 7 поглавља са 32 слике и 24 табеле. Цитирано је 371 литературна навода, а на крају су дате кључне документацијске информације са кратким изводом на српском и енглеском изводу.

#### V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У поглављу **УВОД** аутор указује на значај микотоксина као контаминаната хране микробиолошког порекла, међу којима се по својој токсичности и учесталости појаве, издваја афлатоксин Б<sub>1</sub> (АФБ<sub>1</sub>). Услови повишене температуре и смањене количине падавина фаворизује већу учесталост инфекције са *Aspergillus flavus*, а самим тим и фреквентнију појаву афлатоксина у житима и њиховим прерађевинама. Правилна и прецизна идентификација врста рода *Aspergillus*, особито афлатоксигених сојева је неопходна из разлога што је продуковани АФБ<sub>1</sub> ризичан за здравље људи и животиња, те даје допринос предузимању мера у циљу спречавања контаминације овим микотоксином. Подаци о биотичким и абиотичким факторима који могу утицати на биосинтезу овог токсина, а употпуњени информацијом о фреквенцији и интензитету појаве микобиота присутних у сировинама односно храни представљају важан корак у предвиђању могуће контаминације микотоксинима. Испитивање интеракције *A. flavus* и *Triticum* врста, која је до сада била недовољно испитана, даје допринос повећању доступних података о појави АФБ<sub>1</sub> у житарицама на територији Србије.

У првом делу поглавља **ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ** дати су општи подаци о плеснима и микотоксинима као контаминантима хране. Истакнут је значај рода *Aspergillus* чији се представници јављају у различитим стаништима са широким разноврсношћу деловања и примене. Систематика *Aspergillus* spp. у великој мери није ни данас у потпуности решена па је класификација рода наведена према различитим ауторима. У овом делу су описане морфолошке и молекуларне карактеристике аспергила на којима се темеље методе идентификације овог рода до нивоа врсте. У наставку су истакнуте афлатоксигене врсте рода *Aspergillus*, као и биотички и абиотички фактори који утичу на њихов раст и биосинтезу микотоксина. Описани су генетски и молекуларни аспекти биосинтезе, као и здравствени аспект који се односи на токсиколошки значај афлатоксина Б<sub>1</sub> који је снажан токсин са канцерогеним, тератогеним, мутагеним и имunosупресивним деловањем. Детаљније је размотрена процена ризика која се заснива на проценама опасности или токсичности изазваној афлатоксинима као и очекиваног степена изложености појединца или целе популације, што резултира успостављањем регулаторних нивоа. Прегледом литературних извора дат је приказ значаја старих и нових *Triticum* врста, те наведене нутритивне, биолошке и агрономске карактеристике одабраних *Triticum* spp. Миколошка контаминација *Triticum* spp. утиче на прометни и технолошки квалитет ових врста пшенице, па су размотрени утицаји на поједине параметре квалитета у зависности од нивоа инфекције и контаминације. Сумирани су до сада публиковани подаци о појави и учесталости *A. flavus* и АФБ<sub>1</sub> у *Triticum* spp. У последњем делу овог поглавља наведен је литературни преглед процене ризика појаве *A. flavus* и АФБ<sub>1</sub> у различитим *Triticum* врстама у светлу климатских промена.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** наведен је материјал коришћен у експерименталном раду као и примењене методе рада. Описане су методе одређивања учесталости и интензитета појаве плесни на хлебној пшеници и спелти, као и методе изолације *Aspergillus* врста. Наведене су методе којима је изведена идентификација врсте *A. flavus* на основу макро- и микроморфолошких особина, те методе засноване на молекуларној карактеризацији изолата. Молекуларна идентификација је обухватала методу изолације ДНК, ланчану реакцију полимеразе, дигестију *PCR* продуката рестрикционим ензимима, визуализацију и анализу продуката *PCR* реакције аутоматском *Lab-on-a-Chip* капиларном електрофорезом, затим пречишћавање *PCR* продуката, анализу секвенци и идентификацију *BLAST* методом. Наведене су методе којима је испитан токсигени потенцијал изолата *A. flavus* (квалитативна процедура скрининга – *TLC* методом и квантитативна потврда биосинтезе - *HPLC* анализом). Детаљно је описана инокулација одабраних врста *Triticum* spp. са *A. flavus* у пољским условима. Садржај АФБ<sub>1</sub> у узорцима је одређен применом *HPLC-FLD* технике са постколонском дериватизацијом. У наставку су наведене методе којима су окарактерисана физичко-хемијска својства плевичастих омотача зрна *Triticum* врста. Описан је поступак припреме узорака спелте и инокулума *A. flavus*, затим поступак инокулације и

услови инкубирања (температура складиштења и активност воде) и одређивања АФБ<sub>1</sub> у зрну спелте. Представљене су методе оцене прометног и технолошког квалитета узорака спелте. На крају поглавља су објашњене методе статистичке обраде података.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА** добијени резултати приказани јасно и концизно, одговарајућим редоследом према току истраживања и коришћеним методама. У првом делу представљени су резултати учесталости и интензитета појаве микобиота на узоркованим зрнима хлебне пшенице и спелте током трогодишњег периода (2015-2017). Приказани су резултати идентификације изолованих моноспорних култура *A. flavus* базирани на макро- и микроморфолошкој карактеризацији, као и резултати добијени применом молекуларних техника. Квалитативним скринингом тестиран је потенцијал за биосинтезу АФБ<sub>1</sub> изолата *A. flavus* који је потврђен квантификањем продукованог токсина биосинтетисаног при испитаним условима. У следећем делу овог поглавља приказани су резултати испитивања отпорности различитих *Triticum* spp. на инфекцију *A. flavus* и акумулацију АФБ<sub>1</sub> у пољским условима. Поред тога, у оквиру овог дела дати су резултати о укупном броју плесни, интензиту појаве *A. flavus* и садржају АФБ<sub>1</sub> у узорцима добијеним након инокулације, као и контролним узорцима. Добијени резултати су поређени са резултатима других истраживања, а уочене појаве објашњене у складу са досадашњим сазнањима науке. Анализом резултата који описују физичко-хемијска својства плевичастих омотача зрна *Triticum* врста, указано је на њихов потенцијални допринос на развој *A. flavus* и биосинтезу АФБ<sub>1</sub>. Заштитна улога плевичастих омотача зрна спелте утврђена је приликом испитивања утицаја два кључна параметра складиштења, температуре и  $a_w$  вредности, на акумулацију АФБ<sub>1</sub> у ољуштеним зрнима спелте и зрнима са плевичастим омотачима. Одређени су погодни услови за биосинтезу тј. услови при којима је остварена највећа продукција АФБ<sub>1</sub> у оба типа узорака (зрна спелте без плевичастих омотача и зрна након љуштења) као и у плевичастим омотачима после љуштења. Предложено је неколико математичких модела за предвиђање садржаја АФБ<sub>1</sub> на основу резултата добијених испитивањем утицаја услова складиштења на његову акумулацију. У последњем делу овог поглавља представљени су резултати добијени испитивањем утицаја контаминације спелте афлатоксином Б<sub>1</sub> на одабране параметре прометног и технолошког квалитета. Резултати су обрађени поузданим статистичким методама и јасно су приказани табеларно и графички.

**ЗАКЉУЧЦИ** су добро изведени из добијених резултата, јасно и разумљиво формулисани у складу са постављеним циљевима.

**ЛИТЕРАТУРА** садржи списак 371 литературних навода, цитираних у дисертацији.

У оквиру поглавља **ПРИЛОЗИ** приказане су секвенце PCR продуката депонованих у GenBank бази података.

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

### M20 – Радови у међународном часопису

**Krulj, J., Đisalov, J., Воћаров Станчић, А., Pezo, L., Kojić, J., Vidaković, A. and Bodroža Solarov, M. (2018).** Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> in *Triticum* species inoculated with *Aspergillus flavus*. *World Mycotoxin Journal*, 11(2), 247-257.

SCI листа: област Food Science and Technology (2016) 37/130 (impact f. = 2,189) **M21**

**Krulj, J., Đisalov, J., Bodroža-Solarov, M., Воћаров Станчић, А., Markov, S., Mladenov, N. and Kojić, J. (2017).** First report of *Aspergillus flavus* on organic spelt wheat in Serbia. *Plant Disease* 101, 1045-1045. doi: 10.1094/PDIS-11-16-1593-PDN.

SCI листа: област Plant Science 43/222 (2017) (impact f. = 2,941) **M21**

### M33 – Саопштење са међународног скупа штампано у целини

**Krulj, J., Воћаров Станчић, А., Krstović, S., Kojić, J., Đisalov, J., Brlek, T. and Bodroža-Solarov, M. (2016).** Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* cultures isolated from wheat grains. *Proceedings of the III International Congress "Food Technology, Quality and Safety"*. October, 27-29, 2016. Novi Sad, Serbia, pp. 418-423.

**Krulj, J., Воћаров Станчић, А., Đisalov, J., Kojić, J., Brlek, T., Kos, J. and Bodroža Solarov, M. (2017).** The response of different wheat species to artificial inoculation with *Aspergillus flavus*, V International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry", 15-17.03.2017, Jahorina, Republika Srpska, UDK: 582.28:633.11, pp.749-755.

**Krulj, J., Ћурчић, N., Воћаров Станчић, А., Kojić, J., Marić, B., Perović, J. and M. Bodroža Solarov (2018).** Morphological and molecular characterization of *Aspergillus flavus* isolates from common wheat and spelt grains in north Serbia. *Proceedings of the IV International Congress "Food Technology, Quality and Safety"*. October, 23-25, 2018. Novi Sad, Serbia, pp. 399-404.

### M34 – Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. Ћурчић N., **Krulj J.**, Воћаров Станчић, А., Perović J., Marić B., Kojić, J. and Bodroža Solarov, M. (2018): Identification of the most important *Aspergillus* species by a PCR-RFLP method, IV International Congress „Food

Technology, Quality and Safety“, October, 23-25, 2018., Novi Sad, Serbia, Book of Abstract, p. 163.

2. Ćurčić N., **Krulj J.**, Bočarov Stančić, A., Marić B., Perović J., Kojić, J. and Bodroža Solarov, M. (2018): PCR-RFLP on  $\beta$ -tubulin and calmodulin gene as a tool for rapid identification of the most important species of *Aspergillus*, IV International Congress „Food Technology, Quality and Safety“, October, 23-25, 2018., Novi Sad, Serbia, Book of Abstract, p. 164.

M51 – Рад у водећем часопису националног значаја

**Krulj, J.**, Bočarov-Stančić, A., Krstović, S., Jajić, I., Kojić, J., Vidaković, A. and Bodroža-Solarov, M. (2016). Mycobiota on common wheat (*Triticum aestivum*) and spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) grains from the region of Vojvodina in 2015. Food and Feed Research, 43(1), 1-8.

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

- Детерминацијом плесни са узорака зрна хлебне пшенице и спелте прикупљених из региона Војводине уочен је знатно већи број родова и врста плесни изолованих са зрна хлебне пшенице у поређењу са спелтом током све три посматране године (2015-2017). Најразноврсније микобиоте (24 рода и врсте плесни) детерминисане су на хлебној пшеници из 2017. године. Највећи интензитет појаве тзв. пољских плесни као што су *Alternaria* spp. и *Fusarium* spp. забележен је у узорцима из семи-хумидне 2016. године, док је појава *Penicillium* и *Aspergillus* врста била најинтензивнија у узорцима из семи-аридне 2017. године. Уочене разлике у разноврсности и нивоу миколошке контаминације хлебне пшенице и спелте су последица морфолошких и биолошких својстава ових *Triticum* врста, док су разлике по годинама у оквиру једне врсте биле последица временских прилика током вегетације испитиваних усева.
- Од 6 врста рода *Aspergillus* идентификованих на спелти рода 2017. године, најчесталија је била *A. nidulans* (90%), са интензитетом појаве од 14%, док је на пшеници доминантан био *A. flavus* (учесталост 45%, интензитет појаве 7%).
- Идентификација и карактеризација 38 изолата *A. flavus* одређени су применом полифазног приступа који укључује класичне микробиолошке и молекуларне методе. Упоредивањем фенотипских карактеристика изолата заједно са молекуларном карактеризацијом која је извршена помоћу анализа секвенци ITS и  $\beta$ -тубулин гена, уочена је неопходност примене молекуларних метода у циљу тачне и поуздане идентификације. Раздвајање амплификованих *PCR* продуката различитих изолата на гелу потврђено је секвенцирањем, па се метода ланчане реакције полимеразе у комбинацији са *Lab-on-a-chip* електрофорезом може успешно користити за брзу диференцијацију врста плесни рода *Aspergillus* - секција *Flavi*.
- Испитивањем потенцијала биосинтезе АФБ<sub>1</sub> култура *A. flavus* изолованих са хлебне пшенице и спелте утврђено је да су два изолата (*A. flavus* No. 1 и No. 2) пореклом са хлебне пшенице показала афлатоксигени потенцијал након 14 и 21 дан инкубације на температури 25 °C на подлози YESA у количинама 140  $\mu\text{g}/\text{kg}$  агара, односно 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  агара.
- Тестирањем отпорности различитих *Triticum* врста: хлебне пшенице, спелте, корасан и хибрид пшенице инокулисаних токсигеним изолатима *A. flavus* у фази цветања, квантификован је висок ниво АФБ<sub>1</sub> (256  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) у зрну спелте, док код других *Triticum* врста, АФБ<sub>1</sub> у зрну није детектован (<LOD). Одређивањем физичко-хемијских карактеристика плевичастих омотача *Triticum* врста потврђен је њихов ефекат на раст и развој *A. flavus* и биосинтезу АФБ<sub>1</sub>. Резултати садржаја АФБ<sub>1</sub> у *Triticum* врстама показали су да плевичасти омотачи голозрних врста не пружају повољне услове за раст *A. flavus*, као и биосинтезу АФБ<sub>1</sub>, док је утврђено да је зрно спелте осетљиво на инфекцију проузроковану растом плесни.
- Поређењем укупног броја плесни одређеног на контролним узорцима различитих *Triticum* врста, уочено је да су на зрнима спелте и корасан пшенице, плесни биле присутне у најмањем броју (200 cfu/g односно 250 cfu/g), што потврђује чињеницу да су старе *Triticum* врсте природно отпорније на утицај спољашњих фактора, а самим тим и на инфекцију плеснима. Хлебна пшеница је била највише подложна инфекцији микобиотама (450 cfu/g).
- Испитивањем утицаја различитих температура (15, 23, 30 и 37 °C) и активности воде (0,85; 0,90; 0,95 и 0,99) на синтезу АФБ<sub>1</sub> у инокулисаним узорцима спелте са плевичастим омотачима као и претходно ољуштеним зрнима одређени су погодни услови за биосинтезу АФБ<sub>1</sub>. Услови при којима је остварена највећа продукција АФБ<sub>1</sub> били су температура 30 °C и  $a_w$  0,99 у свим узорцима (зрна спелте инкубирана без плевичастих омотача, плевичасти омотачи и ољуштена зрна). Резултати су показали да је присуство плевичастих омотача представљало заштитну баријеру за развој инфекције и акумулацију АФБ<sub>1</sub>.
- Математички модели, развијени применом фактора са високом значајношћу као што су температура складиштења и активност воде, могу бити коришћени у предвиђању акумулације АФБ<sub>1</sub> у зрну спелте што представља кључни корак у процени ризика.

➤	Различити нивои контаминације спелте са АФБ <sub>1</sub> у поређењу са контролним неконтаминираним узорком утицали су на смањење одређених параметара технолошког квалитета и потенцијалне губитке пецивих својстава спелтиног брашна при садржају АФБ <sub>1</sub> од 50 µg/kg и 250 µg/kg.
<b>VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА</b>	
Приказани резултати дају јасне одговоре на питања која су садржана у циљевима рада. Резултати се тумаче детаљно и јасно и пореде са резултатима других истраживања. Закључци су адекватни, научно оправдани и логично произилазе из добијених резултата. На основу наведеног, Комисија даје позитивну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.	
<b>IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>	
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.
2.	Да ли дисертација садржи све битне елементе <b>Дисертација садржи све елементе неопходне за разумевање обрађене теме и добијених резултата.</b> Дефинисана је тема истраживања, дат приказ владајућих ставова у литератури, приказ експерименталних метода, јасан приказ резултата и њихову дискусију, списак литературе и закључак.
3.	По чему је дисертација оригиналан допринос науци У доступној литератури нема довољно података о инфекцији <i>Triticum</i> врста са <i>A. flavus</i> на територији Србије, па дисертација представља оригиналан допринос познавању распрострањености, биодиверзитета и значаја <i>A. flavus</i> на овом подручју. Истраживања у оквиру ове дисертације дају холистички приступ наведеној проблематици, укључујући више биотехнолошких аспеката како би се омогућило праћење савремених тенденција у производњи здравствено безбедне хране високог нутритивног квалитета. Резултати овог рада допринеће бољем разумевању интеракције микобиоте <i>A. flavus</i> и <i>Triticum</i> врста чиме се даје велики допринос повећању доступних података о појави АФБ <sub>1</sub> у житима. Примењене методе које обезбеђују брзу, ефикасну и поуздану идентификацију врста рода <i>Aspergillus</i> дају допринос предузимању мера у циљу спречавања контаминације. Реализација планираних истраживања је од великог значаја у спровођењу стратегије превенције контаминације хране са <i>A. flavus</i> и АФБ <sub>1</sub> , а самим тим и у смањењу токсичних ефеката које овај микотоксин може да проузрокује. Резултати ових истраживања могу наћи широку примену у производњи, доради и складиштењу зрна и семена <i>Triticum</i> врста, као и у технолошким процесима производње хране за људе и животиње.
4.	Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања Недостаци дисертације нису уочени.
<b>X ПРЕДЛОГ:</b>	
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже да се докторска дисертација под насловом „Потенцијал биосинтезе афлатоксина Б <sub>1</sub> у различитим врстама <i>Triticum</i> spp.“ прихвати, а кандидату Јелени Круљ, мастер инжењеру технологије, одобри одбрана.	

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др Гордана Димић, редовни професор

Др Синиша Марков, редовни професор

Др Драгољуб Цветковић, ванредни професор

Др Марија Бодрожа Соларов, научни саветник

Др Александра Бочаров Станчић, научни саветник