

**НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 04.10.2016.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Марије Петровић, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду бр. 33/11-4.3. од 26.09.2016. године, именована је Комисија за оцену урађене докторске дисертације дипл. инж. Марије Петровић, под насловом ”Добијање нових ликера са функционалним својствима од одабраног лековитог, ароматичног и зачинског биља” у саставу: др Малиша Антић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Мирјана Миловановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Бранислав Златковић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Предраг Вукосављевић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Станислава Горјановић, виши научни сарадник Института за општу и физичку хемију и др Тајјана Шолевић Кнудсен, научни сарадник Института за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду. На основу анализе приложене докторске дисертације подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Марије Петровић, под насловом ”Добијање нових ликера са функционалним својствима од одабраног лековитог, ароматичног и зачинског биља” написана је на 148 страна (проред 1,5) у оквиру којих се налази укупно 22 табеле и 53 слике. У докторској дисертацији је цитирано 335 извора литературе. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику, Садржај, Текст по поглављима, Литературу, Изјаве и Биографију Аутора. Текст дисертације садржи следећа поглавља: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-47), Циљеви истраживања (стр. 48), Материјал и методе (стр. 49-67), Резултати и дискусија (стр. 68-114), Закључци (стр. 115-117) и Литература (стр. 118-148). Поред наведеног садржи: Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **Уводу** дисертације објашњен је значај умерене конзумације алкохолних пића. Укратко је описан начин производње јаких алкохолних пића, у које спадају и ликери на биљној бази, у чији састав често улазе лековите, ароматичне и зачинске биљне врсте. Објашњен је утицај биљака на потенцијална функционална својства пића, са посебним освртом на антиоксидативни и антимикробни капацитет, који потичу од биоактивних компонената, као што су полифенолна, горка, испарљива и друга једињења. С обзиром да су ликери пића која садрже знатну количину средства за заслађивање, најчешће сахарозу, кандидаткиња истиче да би испитивање могућности замене дела сахарозе нискокалоричним заслађивачем на природној бази, конкретно прахом стевиол гликозида, представљало добру основу за добијање пића са нижом калоријском вредношћу, а самим тим и побољшаним функционалним својствима.

Поглавље **Преглед литературе** се састоји од осам потпоглавља у којима су описани до сада објављени резултати других аутора који су директно или индиректно везани за предмет проучавања ове докторске дисертације, као и за методолошке приступе који су коришћени. У првом и другом потпоглављу дат је кратак историјат примене лековитог, ароматичног и зачинског биља у људској исхрани, у прехранбеној индустрији, и, конкретно, у индустрији алкохолних пића. Истакнут је значај биљака за функционалност финалних ликера, при чему је наглашен утицај на антиоксидативне и антимикробне карактеристике пића. У наредном потпоглављу приказане су основе и значај, као и методе сензорне анализе које се користе при развоју нових прехранбених производа. Следећим потпоглављем је обухваћен значај антиоксиданаса за људски организам, а посебна пажња је посвећена фенолним једињења, као носиоцима антиоксидативне активности лековитог, ароматичног и зачинског биља. Након тога, наведене су и описане одабране спектрофотометријске и електрохемијске методе за одређивање антиоксидативне активности. Наредно потпоглавље кандидаткиња је посветила приказу литературних података везаних за антимикробно деловање биљака, као и механизам деловања фенолних, терпенских и осталих биљних компонената, са кратким освртом на одабрану бујон-микродилуциону методу за одређивање антимикробне активности. Прегледом литературе обухваћене су и главне карактеристике одабраних лековитих, ароматичних и зачинских биљних врста, са акцентом на хемијски састав, традиционалну терапеутску примену и доказану биолошку активност. Последње потпоглавље посвећено је биљци стевији (*Stevia rebaudiana* Bertoni) и њеним компонентама, као алтернативним заслађивачима у прехранбеној индустрији, при чему је објашњен значај њихове потенцијалне примене у производњи ликера.

У поглављу **Циљеви истраживања** кандидаткиња је навела научне циљеве који су постављени, почевши од основног циља, који се односио на добијање нових ликера са сензорно најприхватљивијом комбинацијом одабраних дванаест лековитих, ароматичних и зачинских биљних врста, применом одговарајућих метода сензорне анализе. С обзиром на богатство у садржају биоактивних једињења, очекује се да одабране биљке финалном производу дају функционална својства. Као следећи циљ

кандидаткиња је навела испитивање могућности замене дела сахарозе у добијеном ликеру нискокалоричним заслађивачем природног порекла, стевииол гликозидом, који потиче из биљке стевиие (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Затим, циљ дисертације био је утврђивање постигнутих функционалних својстава добијених ликера анализом њихове антиоксидативне и антимикуробне активности, уз поређење са популарним комерцијалним пићима, који спадају у исту или сличну групу производа као добијени ликери. Као посебан циљ истраживања наведена је компаративна анализа антиоксидативне и антимикуробне активности одабраних дванаест лековитих, ароматичних и зачинских биљних врста. Такође, један од циљева дисертације било је и испитивање поузданости примене две релативно нове поларографске методе, НРМС и MRAP, на комплексним узорцима као што су узорци пића и етанолни биљни екстракти, и то применом статистичких метода за поређење резултата свих примењених метода. Као крајњи циљ кандидаткиња наводи анализу испарљиве фракције одабраног ароматичног и зачинског биља.

У поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња даје детаљан опис коришћеног материјала и метода које су примењене у току експеримената. У првом потпоглављу је дат приказ одабраних биљних врста, као полазне сировине за добијање екстраката, односно добијање ликера. Затим је описан начин припреме биљних екстраката, који су даље коришћени за добијање ликера и одређивање антиоксидативне активности. Наредно потпоглавље односило се на добијање ликера, и то првенствено на припрему неколико комбинација различитих удела екстраката из групе биљака са горким материјама и из групе ароматичних и зачинских биљних врста. У истом потпоглављу су наведена комерцијална пића одабрана за поређење, која, као и добијени ликери, спадају у групу аперитива и дигестива: Андерберг (Underberg), Битер 54 (Bitter 54), Битер 55 (Bitter 55), Јегемајстер (Jägermeister), Первиво и Горки лист. Затим су наведене методе сензорне анализе помоћу којих је изабран ликер са сензорно најприхватљивијом комбинацијом биљних екстраката (хедонски тест), а део сахарозе у ликеру замењен одговарајућим уделом праха стевииол гликозида, тако да се не наруши допадљивост производа (метод одређивања магнитуде, дескриптивна сензорна анализа и метод рангирања). На крају потпоглавља наведен је метод бодовања који је коришћен за анализу сензорног квалитета нових ликера и њихово поређење са комерцијалним сличним пићима.

Наредно потпоглавље посвећено је одређивању антиоксидативне активности пића и биљних екстраката, при чему су описане четири најчешће коришћене спектрофотометријске (FC, DPPH, FRAP и TEAC) и две новије поларографске методе (НРМС и MRAP). Метода MRAP је у овом раду по први пут примењена на комплексним узорцима. Израчунавањем корелација између две релативно нове поларографске методе и спектрофотометријских стандардних метода, примена првих је валидирана.

Потпоглавље које се односи на одређивање антимикуробне активности обухвата опис припреме узорка пића и биљних екстраката, припрему култура одабраних микроорганизама, као и поступак примењене бујон микродилуционе методе.

За анализу испарљиве фракције одабраних ароматичних и зачинских биљака, кандидаткиња као примењену методу наводи гасну хроматографију у спрези са

масеном спектрометријом (GC-MS), којој претходи изоловање испарљиве фракције биљака воденом дестилацијом.

Последње потпоглавље односи се на статистичку обраду података.

У поглављу **Резултати и дискусија**, кроз 6 потпоглавља представљени су и интерпретирани резултати истраживања, уз поређење са резултатима других аутора. Дискусија је поткрепљена литературним наводима који указују на сличне или исте резултате. У потпоглављу *Добијање ликера од одабраних лековитих, ароматичних и зачинских биљних врста*, представљени су резултати који се односе на добијање најприхватљивије комбинације екстракта одабраних биљних врста у ликеру, уз додатак 8,5% сахарозе, воде и потребних адитива, а затим и на испитивање сензорних разлика између ликера са сахарозом и различитим уделима праха стевииол гликозида. Хедонским тестом је утврђено да је ликер који је садржао три пута више ароматичних и зачинских биљних врста у односу на биљке са горким материјама, назван “Биљни коктел (БК)”, добио највећи број бодова за све оцењиване параметре (укусност, боју, мирис и укупну прихватљивост), и самим тим је изабран за даља испитивања. Методом одређивања магнитуде утврђена је количина стевииол гликозида потребна да замени интензитет сласти који одговара сласти 8,5% сахарозе у ликеру. Дескриптивном сензорном анализом утврђене су разлике у сензорним атрибутима ликера са различитим уделима сахарозе и стевииол гликозида, а методом рангирања упоређена је њихова допадљивост. Установљено је да су оригинални ликер, у коме је сахароза једини заслађивач, и ликер у коме је 25% укупне масе сахарозе замењено стевииол гликозидом, “Биљни коктел лајт (БКЛ)”, добили сличну и најмању суму рангова, односно да су најбоље прихваћени од стране оцењивача. БКЛ је, зато, заједно са БК, укључен у даља испитивања. На крају потпоглавља је установљено да се сензорни квалитет БК и БКЛ, оцењен је од стране експерата методом бодовања, међусобно не разликује значајно ($p < 0,05$), и да је статистички значајно бољи ($p < 0,05$) у односу на нека комерцијална пића. На основу добијених оцена за одабране параметре, пића БК и БКЛ задовољавају квалитет који се на сајамским оцењивањима награђује сребрном медаљом (16,01 до 18,00 бодова), што се односи на врло добар квалитет.

У потпоглављу *Антиоксидативна активност добијених ликера и поређење са комерцијалним пићима* дат је графички и табеларни приказ резултата одређивања антиоксидативне активности. Корелационом анализом утврђено је да релативно високи статистички значајни коефицијенти корелације ($p < 0,05$) (изнад 0,8, осим у случају корелације између MRAP и DPPH методе) потврђују валидност нове MRAP методе, као и оправданост примене обе поларографске методе на узорцима алкохолних пића. У циљу поузданијег поређења резултата, добијених различитим методама, као и поређења самих метода, уведен је индекс релативне антиоксидативне активности (*Relative Antioxidant Capacity Index – RACI*), као и коефицијент антиоксидативне активности фенола (*Phenolic Antioxidant Coefficients-PAC*). Резултати свих примењених метода и RACI вредности указују је на супериорност БК и БКЛ у односу на пића одабрана за поређење. Такође, БКЛ је имао већу активност и садржај укупних фенола од БК. Овакав резултат би се могао приписати стевииол гликозиду који се налази у саставу БКЛ, и који вероватно доприноси укупној активности пића. Високе PAC вредности за БКЛ и БК, нарочито PAC_{DPPH}, заједно са високим RACI вредностима,

потврђују присуство активних фенола у узорцима. Кластерска анализа резултата добијених применом свих поменутих метода, омогућила је груписање узорака комерцијалних и добијених пића према јачини антиоксидативне активности. На основу добијених резултата пића су груписана на следећи начин: БКЛ, БК и Андерберг су пића са највећом антиоксидативном активношћу, Битер 54 и Битер 55 имају нешто мању активност, а Јегемајстер, Первиво и Горки лист најмању активност.

У потпоглављу *Антимикробна активност добијених ликера и поређење са комерцијалним пићима* испитана је антимикробна активност добијених ликера на одабраним, патогеним сојевима микроорганизама, најчешћих контаминаната хране и узрока тровања, од којих већина изазива инфекције гастроинтестиналног тракта (ГИТ). Антимикробна активност БК и БКЛ је упоређена са активношћу комерцијалних алкохолних пића. Минималне инхибиторне и микробицидне концентрације добијених и комерцијалних пића кретале су се у опсегу од 0,39 % до $\geq 50,00$ % пића у инокулисаном бујону. Најосетљивије међу Грам позитивним бактеријама биле су *L. monocytogenes* и *R. equi*, при чему су БК и БКЛ имали израженију антимикробну активност у односу на комерцијална пића, са микробицидним концентрацијама већ при 0,78 - 3,13 %. Знатно слабија активност установљена је према Грам негативним бактеријама, са инхибиторним и леталним концентрацијама у опсегу од 6,25 % до ≥ 50 %. Сумарно, БКЛ је, у односу на БК, деловао при упола нижим концентрацијама на *S. aureus*, *Salmonella* сојеве, *P. mirabilis*, и *C. albicans*, док је само на *B. spizizenii* и *R. equi* БК испољио јаче дејство. Јаче антимикробно дејство БКЛ на неке тестиране патогене, у односу на БК, се може приписати присуству стевиол гликозида.

Посебан део истраживања кандидаткиња је посветила детаљној анализи антиоксидативне и антимикробне активности одабраних лековитих, ароматичних и зачинских биљних врста, као конституената ликера БК и БКЛ. У потпоглављу *Антиоксидативна активност екстраката одабраних лековитих, ароматичних и зачинских биљних врста*, дат је графички и табеларни приказ резултата компаративне анализе свих одабраних биљака. На основу RACI вредности, редослед антиоксидативних активности биљака био је следећи: подбел > подубица > жалфија > ива > нана > анис > пелин > кичица > лаванда > морач > линцура > коријандер, и у доброј је сагласности са садржајем укупних фенола. Високе статистички значајне корелације ($p < 0,001$) између примењених поларографских и стандардних спектрофотометријских метода (преко 0,9) потврђују поузданост и оправданост примене првих на екстрактима биљака. Кластерском анализом података, добијених свим примењеним методама, одабрани биљни екстракти су, на основу антиоксидативних активности, сврстани у неколико група, при чему подубица и подбел образују групу са највећом антиоксидативном активношћу, жалфија, ива, нана, анис и пелин формирају средње активну групу биљака, док лаванда, кичица, морач, коријандер и линцура спадају у групу слабије активних биљака.

Потпоглавље *Антимикробна активност екстраката одабраних лековитих, ароматичних и зачинских биљних врста*, је, с обзиром на разлику у делотворном опсегу концентрација екстраката из групе биљака са горким материјама и групе ароматичних и зачинских биљака, подељено на два дела. Опсег инхибиторних и микробицидних концентрација екстраката биљака са горким материјама кретао се од

0,70 до $\geq 22,50$ mg/mL, док су екстракти ароматичних и зачинских биљака деловали у опсегу од 0,12 mg/mL до $\geq 7,50$ mg/mL. Под претпоставком да су испарљиви састојци биљака, којих има више у ароматичним и зачинским него у горким биљкама, заслужни за израженију антимикуробну активност првих, а самим тим, и добијених ликера, у следећем потпоглављу *Састав испарљиве фракције одабраних ароматичних и зачинских биљних врста*, табеларно су приказани резултати GC-MS анализе њихових етарских уља. Утврђено је да су најзаступљеније испарљиве компоненте нане: L-ментон, ментол, изоментон и ментил ацетат и еукалиптол; жалфије: тујон (α и β), камфор, 1,8-цинеол, ледол, камфен, борнеол, борнил ацетат, α -хумулен, α -пинен и манол; лаванде: линалол, линалил ацетат, лавандулол, лавандулил ацетат, α -терпинеол, кариофилен, кариофилен оксид; аниса: транс-анетол, γ -химакален, естрагол, цис-анетол и α - химакален; коријандера: β -линалол, α -пинен и γ -терпинен; морача: транс-анетол, лимонен и фенкон.

Поглавље **Закључак** садржи правилно изведене закључке који произилазе из добијених резултата.

На бази водено-етанолних екстраката одабраних дванаест врста лековитих, ароматичних и зачинских биљака (нана, жалфија, лаванда, анис, морач, коријандер, кичица, линцура, пелин, ива, подубица, подбел) добијен је биљни ликер, назван “Биљни коктел (БК)”, који је садржао биљке са горким материјама и ароматичне и зачинске биљне врсте у односу 1:3.

Установљено је да је могуће 25% укупне масе сахарозе заменити нискокалоричним заслађивачем стевиол гликозидом, без нарушавања сензорне прихватљивости. Добијени ликер назван је “Биљни коктел лајт (БКЛ)”.

Установљена је знатна антиоксидативна активност добијених пића, БК и БКЛ. Кластерском анализом података, добијених свим методама за одређивање антиоксидативне активности, комерцијална и добијена пића су, по јачини антиоксидативне активности, подељена у неколико група, при чему БК и БКЛ спадају у групу најактивнијих, са кластером знатно удаљеним од осталих кластера.

Ликер са стевиол гликозидом је, код свих примењених метода, испољио јачу антиоксидативну активност, у односу на ликер у коме је сахароза била једини заслађивач, што указује на побољшање функционалности ликера додатком слатких изолата из биљке стивије.

Утврђена је антимикуробна активност добијених ликера, БК и БКЛ, према одабраним сојевима патогених микроорганизама, најчешћих контаминаната из хране. Инхибиторна активност и летални ефекат БК и БКЛ према Грам позитивним бактеријама био је јачи него према Грам негативним бактеријама.

Ликер БКЛ је на неке микроорганизме (*S. aureus*, *Salmonella* сојеve, *P. mirabilis* и *C. albicans*) деловао при упола нижим концентрацијама у односу на БК, што се може приписати утицају стевиол гликозида, који, очигледно, доприноси побољшању функционалности пића.

Кластерском анализом резултата свих примењених метода за одређивање антиоксидативне активности утврђено је да подбел и подубица формирају групу биљака са најизраженијим антиоксидативним капацитетом, па се може закључити да ове биљке имају значајан допринос у антиоксидативној активности ликера БК и БКЛ.

Треба имати у виду и могућност синергистичког деловања биљака при утицају на укупну антиоксидативну активност ликера, као њихове мешавине.

Метода НРМС је, у овом раду, по први пут примењена на узорцима водено-етанолних екстраката биљака, док је метода MRAP, по први пут примењена на комплексним узорцима. Високи коефицијенти корелације обе поларографске методе са осталим примењеним, спектрофотометријским методама, потврдили су оправданост примене обе методе на алкохолним пићима и биљним водено-етанолним екстрактима.

На основу резултата испитивања антимикуробне активности екстраката одабраних биљних врста, утврђено је да група ароматичних и зачинских биљних врста делује у вишеструко нижим концентрацијама у односу на горке. На основу тога је закључено да највећи допринос у антимикуробној активности ароматичних и зачинских биљака (жалфија, нана, анис, коријандер, морач и лаванда) имају терпени, који се налазе у испарљивој фракцији ових биљака, а у већем уделу у односу на горке биљне врсте.

У поглављу **Литература** наведен је списак од 335 референци. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива сва поља истраживања и разматрана питања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Марије Петровић, под насловом ”Добијање нових ликера са функционалним својствима од одабраног лековитог, ароматичног и зачинског биља” је резултат успешно спроведеног научног рада кандидаткиње, која је у сагласности са планом истраживања прихваћеним приликом пријаве дисертације. Дисертација представља оригиналан и самосталан научни рад од научног и практичног значаја.

Комисија налази да је дисертација у складу са препорученим тематским научним областима, а у вези са креирањем нових производа. Током истраживања су стечена нова сазнања и проширена досадашња искуства, с обзиром да је добијен нов производ, са функционалним карактеристикама и допадљивим сензорним својствима. Научни допринос огледа се у детаљној анализи биолошке активности финалног производа истраживања, ликера, али и његових биљних конституената, одабраних лековитих, ароматичних и зачинских врста. Поред примене како стандардних, често примењиваних у истраживању су коришћене и новије методе, од којих је једна по први пут примењена на комплексним узорцима. Значај истраживања огледа се и у томе што је у добијеним ликерима, који су због присуства знатне количине шећера сами по себи пића са великом калоријском вредношћу, замењен део сахарозе нискокалоричним заслађивачем. На основу претраге тржишта и литературних података нискокалорични заслађивачи у ликерима још увек нису примењени. Природно порекло заслађивача на бази биљке стевије, у том случају, је додатни разлог за афирмацију једне овакве иновације.

Полазећи од наведених констатација, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Марије Петровић, под насловом: „Добијање нових ликера са функционалним својствима од одабраног лековитог, ароматичног и зачинског биља“, и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

Чланови комисије

др Малиша Антић, редовни професор
Универзитета у Београду, Пољопривредни
факултет, Ужа научна област: Хемија

др Мирјана Миловановић, редовни професор
Универзитета у Београду, Пољопривредни
факултет, Ужа научна област: Хемија

др Бранислав Златковић, редовни професор
Универзитета у Београду, Пољопривредни
факултет, Ужа научна област: Наука о
конзервисању

др Предраг Вукосављевић, ванредни
професор Универзитета у Београду,
Пољопривредни факултет, Ужа научна
област: Наука о конзервисању

др Станислава Горјановић, виши научни
сарадник Института за општу и физичку
хемију, Ужа научна област: Биохемија

др Татјана Шолевић Кнудсен, научни
сарадник Института за хемију, технологију и
металургију, Универзитета у Београду, Ужа
научна област: Хемија

Прилог

Радови проистекли из докторске дисертације Марија Петровић, објављени у часописима са SCI листе:

Sužnjević, D., Petrović, M., Pastor, F. T., Veljović, M., Zlatanović, S., Antić, M., & Gorjanović, S. (2015): “*Reduction of Hg²⁺ by Individual Phenolics and Complex Samples and Its Application in Polarographic Antioxidant Assay*”. *Journal of The Electrochemical Society*, 162(7), H428-H433.

Petrović, M., Sužnjević, D., Pastor, F., Veljović, M., Pezo, L., Antić, M., & Gorjanović, S. (2016): „*Antioxidant capacity determination of complex samples and individual phenolics-Multilateral approach*“, *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 19(1):58-65.