

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 356/3 -7.5.
Датум: 26.12.2012. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. став 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета" број 131/06), дате сагласност на извештај о урађеној докторској дисертацији кандидата мр ЈОВАНКЕ ЛАЛИЧИЋ - ПЕТРОНИЈЕВИЋ.

Кандидат **мр ЈОВАНКА (Гојко) ЛАЛИЧИЋ - ПЕТРОНИЈЕВИЋ**, пријавила је докторску дисертацију под називом: «СЕНЗОРНА, АНТИОКСИДАТИВНА И РЕОЛОШКА СВОЈСТВА РАЗЛИЧИТИХ ВРСТА ЧОКОЛАДА СА ПРОБИОТИЦИМА»,

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 25.01.2011. године, својим актом 02 број 6-189/20 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «СЕНЗОРНА, АНТИОКСИДАТИВНА И РЕОЛОШКА СВОЈСТВА РАЗЛИЧИТИХ ВРСТА ЧОКОЛАДА СА ПРОБИОТИЦИМА».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације мр ЈОВАНКЕ ЛАЛИЧИЋ-ПЕТРОНИЈЕВИЋ, образована је на седници одржаној 24.10.2012. године, одлуком Факултета број 356/1-5.5. у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Јованка Попов Раљић, ред.професор, Наука о преради ратарских сировина,
2. др Драгојло Обрадовић, ред.професор, Технолошка микробиологија,
3. др Зорица Радуловић, ванр.професор, Технолошка микробиологија,
4. др Драженка Комес, ванр.професор, Прехрамбена технологија-инжењерство,
5. др Радомир Радовановић, ред.професор, Управљање безбедношћу и квалитетом хране,
6. др Виктор Недовић, редовни професор, Наука о врењу.

Наставно-научно веће Пољопривредног факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, на седници одржаној 26.12.2012. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 356/3-7.5.
Датум: 26.12.2012. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 73. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 26.12.2012. године, донело је

ОДЛУКУ

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **мр ЈОВАНКА ЛАЛИЧИЋ - ПЕТРОНИЈЕВИЋ** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«СЕНЗОРНА, АНТИОКСИДАТИВНА И РЕОЛОШКА СВОЈСТВА РАЗЛИЧИТИХ ВРСТА ЧОКО-ЛАДА СА ПРОБИОТИЦИМА».**

II Универзитет је дана 25.01.2011. године, актом број 02 број 6-189/20 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Jovanka Popov-Raljić, **Jovanka Lalicić-Petronijević** (2009). Sensory Properties and Color Measurements of Dietary Chocolates with different Composition During Storage for Up to 360 days. *Sensors*, 9 (3), 1996-2016; doi:[10.3390/s90301996](https://doi.org/10.3390/s90301996) ISSN: 1424-8220.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору проф. др Јованки Попов Раљић, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

**Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације
мр Јованке Лаличић-Петронијевић**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета бр. 356/1-5.5 од 24.10.2012. године, именовани смо у Комисију за оцenu урађене докторске дисертације под насловом **„Сензорна, антиоксидативна и реолошка својства различитих врста чоколада са пробиотицима“** коју је поднела мр Јованка Лаличић-Петронијевић (бр.1289/4 од 04.10.2012.).

На основу прегледа, анализе и оцене докторске дисертације, Комисија подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мр Јованке Лаличић-Петронијевић под насловом **„Сензорна, антиоксидативна и реолошка својства различитих врста чоколада са пробиотицима“** написана је на 285 страна (формат А4), 13 страна Прилога и укорићена тврдим повезом. Поред уобичајених уводних делова (насловна страна, списак чланова комисије, кратак садржај на српском и енглеском језику са кључним речима, садржај) докторска дисертација има седам поглавља: **1. Увод** (1-3 стр.); **2. Преглед литературе** (4-122 стр.); **3. Циљ истраживања** (123-124 стр.); **4. Материјал и методе рада** (125-153 стр.); **5. Резултати и дискусија** (154-257 стр.); **6. Закључци** (258-263 стр.); **7. Литература** (264-285 стр.). Прилог садржи 3 табеле (286-288 стр.), као и Листу скраћеница (289-291 стр.), Списак табела (292-293 стр.), Списак слика (294 стр.) и Списак графика (289-298 стр.). У дисертацији је приказано 35 табела, 24 слике и 55 графика. Приказане табеле су добро оформљене и прегледне, слике су илустративне и укомпоноване у текст, а графици су приказани у боји и омогућавају добро праћење резултата истраживања.

2. Приказ и анализа докторске дисертације

У поглављу **Увод** констатује се да је чоколада, као комплексна суспензија, намирница која приликом конзумирања побуђује читав низ стимуланаса који активирају центре за задовољство у људском мозгу, што је чини једним од најомиљенијих прехранбених производа у свету. Мада се основне енергетске потребе организма чоколадом могу задовољити релативно брзо, кандидат наглашава да савремени концепт исхране налаже употребу намирница са додатом вредношћу, које имају терапеутски и превентивни значај.

Развој нових технологија омогућава измену састава хране на такав начин да се њоме остварују додатни позитивни утицаји на здравље људи. Таква „функционална храна“ омогућава потрошачима побољшање рада циљаних физиолошких функција у организму. У том светлу, кандидат истиче пробиотике као једну од компонената функционалне хране која се најбрже развија. Кандидат подсећа да су традиционални извори („носачи“) бактерија млечне киселине производи од млека. Међутим, за одређени, не тако занемарљиви део популације употреба производа од млека је лимитирана, било због начина исхране, из традиционалних или економских разлога, или, пак, због интолеранције на лактозу, подизања нивоа холестерола у серуму и појаве алергије на млечне протеине. Такође, поменути производи морају се чувати на

температури хлађења и карактерише их релативно картак рок одрживости. Алтернативна стратегија за повећање ефикасности дејства пробиотика би била употреба прехранбених матрикса који природно садрже висок ниво компонената са протективним својствима. Наведено је представљало повод да се испита чоколада као систем за интестиналну доставу пробиотика, имајући у виду да би какао-маслац у њеном саставу могао да обезбеди заштиту пробиотским бактеријама, као и чињеницу да рок одрживости чоколаде знатно премашује онај код производа од млека. Обогаћивање различитих врста чоколада бактеријама млечне киселине са пробиотским својствима допринело би повољнијем утицају ових производа на здравље људи. Кандидат наглашава да је овакав приступ од изузетне важности, посебно уколико се има у виду да се чоколада често конзумира међу децом.

Међутим, истиче се да је инкорпорирање пробиотика у храну везано, пре свега, за озбиљну препреку која проистиче из саме њихове дефиниције: до пробавног тракта, места деловања, пробиотске бактерије морају доспети – живе и у довољном броју. Њихово преживљавање повезано је са бројним препрекама, како оним током производње хране, тако и са самим дигестивним процесом, чије превазилажење свакако представља својеврстан изазов.

Сензорна својства чоколаде представљају кључни фактор при пласирању новог производа на тржиште. С тим у вези кандидат констатује да би чоколаде обогачене пробиотским бактеријама морале задржати привлачан изглед, правилан прелом, хомогену текстуру, постепену топивост, својствен мирис и укус и добру одрживост током складиштења. Кандидат сматра да је важно очување и реолошких карактеристика чоколаде које пружају информације везане за њихова сензорна својства.

Кандидат посебно истиче значај конзумирања чоколаде која се у XXI веку не сматра само “посластицом за повлађивање”, већ је у научној литератури и стручним круговима призната због високог садржаја полифенолних компонената са антиоксидативним, антирадикалским и антиканцерогеним дејством. У том смислу постизање изражених функционалних својстава чоколаде која не потичу само од пробиотских микроорганизама, представља допунску вредност у креирању категорије оваких производа који би био прихватљив широком кругу потрошача.

Поглавље **Преглед литературе** структурирано је тако да садржи две велике целине. Прва целина формирана је са циљем да се из различитих угла третира **чоколада као производ**, са посебним освртом на њена сензорна, антиоксидативна и реолошка својства. У том смислу прво се наводи које врсте чоколаде постоје и њихове међусобне разлике. С обзиром на то да се врсте чоколаде одређују на основу сировинског састава и примењеног технолошког поступка произвођење, у наставку кандидат даје преглед хемијског састава чоколаде у погледу садржаја угљених хидрата, масти, протеина, минералних материја, витамина, као и млека, неизоставне компоненте млечних чоколада. Имајућу у виду да је какао-маслац најесенцијалнији састојак чоколаде, који је због својих специфичних карактеристика топљења и очвршћавања одговоран за читав низ својстава квалитета финалног производа, посебан простор посвећен је управо овој масти, тј. њеној кристализацији. Уз велики број литературних навода обрађен је феномен полиморфизма какао-маслаца, као и карактеристике полиморфних облика, фазне трансформације и структура паковања триглицерида. Кандидат се осврнуо и на недоумице које се јављају у литератури у вези са постојањем појединих полиморфних форми и номенклатуром. У наставку је дат технолошки поступак производње чоколаде од какао-зрна до упакованих табли, уз навођење значаја и улоге најважнијих технолошких операција: мешање, рафинација, кончирање, темперирање, обликовање, хлађење и паковање. Грешке у било којој фази технолошког поступка израде чоколаде, за последицу имају промену њених својстава квалитета. Сивљење чоколаде је једно од најчешћих мањкавости чоколаде и представља највећи проблем везан за квалитет у кондиторској индустрији. Иако настанак овог сивобеличастог филма од кристала масти на површини или унутрашњости чоколаде не представља безбедносни хазард по потрошаче, оно ипак чини производ непривлачним

за конзумирање, те стога непогодним за тржиште и потрошњу. Постојање могућности да додаток нових компонената (као што су пробиотици) у чоколаду доведе до ремећења њене хомогености и/или кристалографске структуре, и, последично, до појаве сивљења, било је мотив кандидату да се посвети изучавању поменутог феномена и механизма његовог настанка.

Сензорна својства представљају један од најважнијих параметара у дефинисању укупног квалитета производа и у највећој мери опредељују потрошаче при избору одређене врсте хране. Наведено има посебан значај код чоколаде, која се, пре свега, конзумира из хедонистичких разлога и спада у ретке намирнице које доводе до настанка жудње (*chocolate craving*) - феномена који је узрокован њеним сензорним својствима. Због тога и не изненађује концепт по којем је кандидат дао предност сензорним у односу на остала својства, у погледу редоследа приказа. Чоколада, са аспекта потрошача, мора да има привлачан изглед (боја, сјај, површина, облик), одговарајућу чврстоћу при собној температури, правилан прелом, својствен мирис и укус и добру одрживост током чувања и складиштења. У том светлу наводе се три основна сензорна својства квалитета: изглед, текстура и арома (мирис и укус) који су кроз радове многих аутора обрађени сваки засебно, али се кандидат осврнуо и на интеракције које се међу њима јављају. Кандидат указује на пресудан значај сензорне анализе у процесу развоја нових производа са функционалним својствима. Иако повећање функционалности хране не мора обавезно да промени њен сензорни квалитет, резултати неколико студија показују да потрошачи нису спремни да подреде сензорна својства функционалне хране евентуалним добробитима по здравље. Комбинација сензорног оцењивања са инструменталном анализом обезбеђује важне информације и даје комплетнију слику производа који се испитује. Имајући наведено на уму, као и поменути утицај појаве сивљења на квалитет чоколаде, као посебно подпоглавље у оквиру сензорне анализе размотрене су карактеристике квалитета боје чоколаде, уз навођење основних термина и параметара преко којих се дефинише боја у различитим системима мерења (CIE, CIE $L^*a^*b^*$ и Hunter), те утицају различитих фактора на промену боје чоколаде. Током производње чоколаде кристално стање и удео присутне чврсте масне фазе (садржај чврстих триглицерида) су важни у детерминисању карактера топљења финалног производа. Диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC) користи се како би се утврдиле промене у профилу топљења чоколаде мерењем релативног износа сваког кристалног облика, при чему добијени пикови кореспондирају латентној топлоти а опајају се у температурном опсегу отапања специфичног полиморфног облика какао-маслаца. Кандидат истиче да је таква информација релевантна за сензорни карактер и утиче на механичка и реолошка својства чоколаде као и на њену трајност.

У последњој деценији чоколада је изазвала велики интерес научне јавности захваљујући, углавном, садржају полифенолних компонената. У оквиру овог дела кандидат даје темељан приказ састава полифенола какао и чоколаде, уз образлагање утицаја појединих фактора, као што су ферментација какао-зрна и поједине фазе производње чоколаде, на њихов садржај. Такође се наводе и разлике у садржају фенолних компонената у зависности од врсте чоколаде, односно садржаја немасних какао-делова који су и носиоци ових биоактивних састојака, уз констатацију поткрепљену многим радовима, да су црне чоколаде богатије полифенолима од млечних, као и да са порастом удела какао-делова расте и количина полифенола. Значај присуства ових компонената кандидат види у супериорнијем садржају ових компонената у чоколади у односу на неке друге намирнице богате полифенолима, као и у њеној широкој потрошњи. Даље се кандидат бави утицајима полифенола на здравље, наводећи да се у многим студијама они истичу као фактори који превентирају кардиоваскуларна обољења и ублажавају инфламаторне реакције. Олигомерни проантоцијанидини изоловани из какао показују биолошку активност потенцијално значајну за одбрану од оксиданаса и за функционисање имуног система. Препознавање многих бенефита по здравље које испољавају полифенолне компоненте, охрабрило је научнике широм света да се баве одређивањем антиоксидативног капацитета

различитих производа биљног порекла. Међутим, стандардизована метода за одређивање антиоксидативних својстава одређене врсте хране још није установљена, тако да се за оцену антиоксидативног капацитета препоручује употреба више различитих метода.

Кандидат је посветио неопходан простор разматрању реолошких карактеристика чоколаде, с обзиром на њихову улогу у производном процесу при добијању висококвалитетних производа са добро дефинисаном текстуром. Отопљена чоколада представља комплексан реолошки систем у којем су чврсте честице дисперговане у масној фази, због чега чоколадна маса испољава одређене специфичности у својствима тока. Након прегледа параметара који дефинишу реолошко понашање чоколаде, кандидат наводи читав низ фактора који на њега утичу, као што су стратегија вођења технолошког поступка, расподела честица по величини и састав (удео масти, шећера, емулгатора, млека, воде).

У циљу заокруживања приказа чоколаде као финалног производа, кандидат наводи карактеристике амбалажних материјала као важних чинилаца у процесу одржавања нутритивне вредности и квалитета.

Друга целина Прегледа литературе посвећена је **пробиотским бактеријама** као функционалним додацима храни. Кандидат приступа приказу пробиотског концепта темељно, почевши од историјских података везаних за прву употребу пробиотика. Потом наводи промене састава микрофлоре гастроинтестиналног (ГИ) тракта човека током живота како би се указао на снажан утицај који она остварује на нутритивне, физиолошке и протективне процесе у организму. Данас је широко прихваћена дефиниција пробиотика, да су то живи микроорганизми који, примењени у адекватним количинама, испољавају позитивне ефекте по здравље домаћина. Пробиотски ефекат ових микроорганизама се приписује њиховој улози у одржању равнотеже интестиналне флоре, производњи органских киселина и/или бактериоцина, конкуренцији са патогенима, као и јачању имуног система. Најчешћи пробиотици су бактерије млечне киселине из рода *Lactobacillus* spp., као и неки сојеви из рода *Bifidobacterium* spp. чије опште карактеристике наводи кандидат. Следи преглед механизма деловања пробиотика који су до данас проучени, као и приказ њихових вишеструких утицаја на здравље који могу бити нутритивни и терапеутски. Будући да се сва повољна својства не могу приписати свакој врсти пробиотика, већ да она морају бити специфична на нивоу соја и добро документована клиничким и другим доказима, кандидат даје преглед повољних ефеката на здравље сојева пробиотских бактерија коришћених током приказаног експеримента. Кандидат наводи да се пробиотски микроорганизми могу користити у хуманој исхрани уколико у потпуности задовољавају бројне критеријуме и то: опште карактеристике (порекло, дефинисаност, безбедност, резистентност на деловање желудачних сокова и киселина); функционални аспект (способност адхезије, антимикуробна активност, негативни ефекти); технолошки аспект (преживљавање током процеса производње и чувања производа). Технолошки аспект селекције пробиотика кандидат сматра веома значајним и издваја га као посебно подпоглавље. Цитирајући савремену литературу кандидат наводи чиниоце од значаја приликом примене пробиотика у храни, начине њиховог инкорпорирања у различите намирнице, као и факторе који утичу на способност пробиотика да преживе у храни: физиолошко стање пробиотика, температура, активност воде, кисеоник, рН, компатибилност пробиотика са осталим компонентама хране. Надаље се указује да поједина истраживања скрећу пажњу на могуће постојање интеракције између пробиотских бактерија и антиоксидативних компонената хране богате полифенолима. Поменута дејства могу утицати повољно или инхибиторно на раст пробиотских микроорганизама, или пак, могу довести до слабљења АО активности намирница. Као елементи који могу довести до смањења броја живих ћелија пробиотика наводе се одређени поступци током производње и манипулације намирнице. Као један од начина заштите корисних пробиотских бактерија кандидат истиче микроинкапсулацију. Микроинкапсулација се дефинише као процес „паковања“ осетљивог материјала у специјалне полупропустљиве полимерне мембране, при чему се формирају капсуле или

честице, које могу да отпусте свој садржај при контролисаним и специфичним условима. За микроинкапсулацију пробиотика користе се технике екструзије, емулзионе технике, технике сушења (сушење у флуидизованом слоју, спреј сушење, лиофилизација) као и технике спреј-облагања. Суштина ових техника је да обезбеде заштиту пробиотицима од неповољних услова средине како би у довољном броју доспели у ГИ тракт, где треба да испоље свој позитиван ефекат.

У трећем поглављу кандидат износи научни **циљ истраживања**, заснован на проблематици изнесеној у делу Преглед литературе. Примарни циљ састојао се у утврђивању оптималних концентрација пробиотика које би биле инкорпориране у чоколадне масе различитог састава (удео какао-делова, масти, шећера и/или млека) како би се добио производ са функционалним својствима. Следећи важан задатак било је праћење вијабилности додатих пробиотских бактерија након производње и током складиштења на температурама од 4°C и 20°C, као и одређивање рока функционалности финалних производа.

Поред наведеног, циљ је био да се утврде евентуални утицаји пробиотских бактерија на:

1. сензорна својства квалитета чоколада (изглед, текстура, арома), са посебним освртом на промену боје и термалних својстава;
2. садржај полифенолних једињења као и антиоксидативни капацитет чоколада;
3. реолошке карактеристике (приносни напон, вискозитет),

у периоду од 0-30, 90 и 180 дана складиштења.

Такође, један од задатака представљало је испитивање погодности употребљених амбалажних материјала за паковање чоколада са пробиотицима.

Четврто поглавље се односи на детаљан приказ **Материјала и метода** коришћених током израде докторске дисертације. Кандидат најпре наводи врсте чоколада које су коришћене у експерименту, односно њихов састав, садржај какао-делова и ознаке: ML (млечне чоколаде), M (црне чоколаде са 44% какао-делова) и C (црне чоколаде са 75% какао-делова). Као радни микроорганизми употребљене су следеће пробиотске бактерије: *Lactobacillus acidophilus* NCFM[®], комерцијалног назива HOWARU DOPHILUS (Danisco, Данска) (са ознаком D) и *Bifidobacterium lactis* HN019, комерцијалног назива HOWARU BIFIDO (Danisco, Данска) (са ознаком B), које су биле у лиофилизованом облику, као и DUOLAC MIX L3 микроинкапсулисана мешавина пробиотских култура: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium breve* (Cell Biotech, Данска) (са ознаком L3), обавијених двоструким (протеинским и полисахаридним) омотачем.

Потом је дат детаљан приказ поставке експеримента и коришћене опреме, који је, уз дидактички јасна објашњења, визуелно приближен помоћу 13 слика и 5 табела. Унутар поглавља прецизирано је да је производња узорака чоколада са пробиотицима, као и контролних узорака, обављена у погонима фабрике “Штарк”, а.д. Београд. Целокупан експеримент подељен је у три фазе. **Прва фаза** је подразумевала обављање прелиминарног огледа којим су, кроз низ проба, установљене оптималне концентрације пробиотика које је потребно додати у чоколадне масе различитог састава ради постизања функционалних ефеката, без непотребних прекорачења у додатим количинама и уз очување својствених сензорних карактеристика финалних производа. На бази података добијених прелиминарним огледом спроведена је **друга фаза** која је обухватала поступак производње различитих врста чоколада са 3 пробиотска препарата утврђених концентрација. Након производње финални производи су упаковани у одговарајућу амбалажу, складиштени на собној температури (20°C) и даље испитивани током периода чувања. Један део чоколада од сваке врсте је складиштен и на температури хлађења (4°C), ради утврђивања вијабилности под различитим условима чувања. **Трећа фаза** истраживања подразумевала је, пре свега, праћење вијабилности додатих пробиотских сојева током складиштења. Вијабилност је изражена као cfu/g, односно јединице које стварају колоније, а одређивана је 5., 30., 90., 120., 150. и 180. дана складиштења у три понављања. Број живих ћелија у узорцима чоколада одређиван

је прављењем основног разређења (10 g испитиваних узорак чоколаде у 90 ml физиолошког раствора хомогенизовано у Stomacher апарату (Lab Blender Stomacher 400, Seward, UK)). Даљим децималним разређењем добијена су разређења која су засејавана на одговарајуће селективне подлоге. Надаље, овим делом експеримента обухваћено је испитивање појединих својстава чоколаде, релевантних за овакву врсту производа. Основни хемијски састав (садржај воде, протеина, масти, сахарозе) одређен је прописаним стандардизованим методама према Правилнику о методама узимање узорака и методама вршења хемијских и физичких анализа какао-зрна, какао-производа, производа сличних чоколади, бомбонских производа, крем-производа, кекса и производа сродних кексу, (Сл. лист СФРЈ бр. 41/1987). Укупни угљени хидрати су израчунати на основу претходно одређених вредности за садржај протеина, масти и шећера (разлика до 100 %), у циљу добијања енергетске вредности, која је израчуната на основу резултата и литературних навода, и изражена у kJ/100 g производа. Хемијска испитивања обухватила су и одређивање активности воде на a_w метру TH2/RTD-33/BSK, Novasina (Швајцарска).

Укупан сензорни квалитет свих испитиваних узорака чоколаде са пробиотицима током периода складиштења утврђен је применом модификоване методе сензорног оцењивања чоколаде (Попов-Раљић и Лаличић-Петронијевић, 2009), а изражен је као "% од максимално могућег квалитета" и пондерисана средња вредност оцено, према којој је одређена категорија квалитета. Претходно су одабрана репрезентативна својства квалитета чоколаде: изглед (боја, сјај, облик, површина), текстура (механичка својства: тврдоћа, ломљивост, жвакљивост, адхезивност; геометријска својства: зрнавошћ; површинска својства: влажност и масност; остала динамичка својства: топовост) и арома (мирис и укус). У циљу објективизације и поуздане сензорне евалуације у оцењивању су учествовали одабрани оцењивачи (5) који су прошли избор, обуку и праћење према захтевима стандарда *ISO 8586-1:1993E* и *ISO 8586-2:1994E* тј. *SRPS ISO 8586-1:2002* и *SRPS ISO 8586-2:2002*, а само оцењивање обављено је у Лабораторији за сензорну анализу Пољопривредног факултета. Карактеристике квалитета боје анализираних узорака чоколаде са пробиотицима, као и контролних узорака, одређене су на горњој и доњој површини чоколадних табли помоћу фотоелектричног тристимулусног колориметра MINOLTA Chroma Meter CR-400. Резултати су интерпретирани у три различита система дефинисања боје: CIE xY (средња рефлектанца Y (%), доминантна таласна дужина λ (nm), чистоћа боје $\check{C}$ (%)), CIE $L^*a^*b^*$ и Hunter Lab систему (психометријска светлост (L^* и L_{Hu}), психометријски тон (a^* и a_{Hu}) и психометријска хрома (b^* и b_{Hu})). Ради инструменталног одређивања својстава топовости прибегнуто је термалној анализи различитих чоколаде са пробиотицима и контролних узорака која је обављена применом диференцијалне скенирајуће калориметрије (DSC) на апарату DSC Q1000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) са RSC хладњаком, у температурном опсегу од 2-60°C, брзином грејања/хлађења $Hr=5^\circ\text{C}/\text{мин}$, у алуминијумским чанчићима при протоку азота од 50 ml/min. Обрада DSC кривих, одређивање температуре топљења и кристализације узорака чоколаде (T_m и T_c), као и енталпије наведених процеса (ΔH_{melt} и ΔH_{crist}) извршена је помоћу програм TA Universal Analysis 2000.

Пре одређивања садржаја полифенолних једињења узорци чоколаде су одмешћени према поступку *Adamson-a и cap. (1999)*, након чега је обављена екстракција 70 % -тним метанолом. Укупни феноли одређени су спектофотометријски Folin – Ciocalteu-овим реагенсом, уз читавање апсорбанције на 756 nm, а резултати су изражени као mg GAE/g одмашћене чоколаде. При свим спектрофотометријским одређивањима коришћен је спектрофотометар Helios γ , (ThermoSpectronic, UK). Укупни флавоноиди одређени су формалдехидом, а након филтрирања даље остатак нефлавоноидних фенола према методи за укупне феноле (*Ough и Amerune, 1988*). Укупни флавоноиди одређени су на основу разлике: укупни феноли – укупни нефлавоноиди, и изражени као mg GAE/g одмашћеног узорка. Флаван-3-оли су одређени ванилинским тестом, као и реакцијом са *p*-диметиламино-цинамалдехидом (*p*-DAC)(*Di Stefano и cap., 1989*) и изражени као mg (+)-катехина/g одмашћеног узорка.

Садржај укупних проантоцијанидина утврђен је модификованом методом по Bate-Smith-у (*Porter и сар., 1986*) мерењем апсорбанце на 550 nm. Резултати су приказани као mg цијанидин-хлорида/g одмашћеног узорка. За одређивање антиоксидативног капацитета узорака чоколаде коришћене су две спектофотометријске методе FRAP ($\mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$ одмашћеног узорка чоколаде) и ABTS ($\mu\text{mol Trolox-a}/\text{g}$ одмашћеног узорка чоколаде). Поред наведених метода, у овом докторском раду је употребљена и нова, поларографска метода (HPS) за одређивање антиоксидативности, која је по први пут примењена на екстракте узорака чоколаде. Мерења су обављена на поларографском уређају PAR (Princeton Applied Research) 174A са прикљученим X-Y писачем (Hoyston Instryments, Omnigraph 2000) за аутоматско бележење поларографских i-E кривих, чији је рад кандидат детаљно описао. Резултати су приказани графички и изражавају зависност процента смањења струје водоник-пероксида од запремине додатог узорка, а активност испитиваних узорака изражена је као нагиб праволинијског дела те зависности.

Масти екстраховане из анализираних узорака различитих врста чоколаде употребљене су за одређивање оксидативне стабилности, тачније индукционог времена оксидације (OIT) и температуре почетка оксидације (OOT) применом DSC према стандарду *ASTM E 1858-08*, односно *ASTM E 2009-08*, уз употребу програма TA Universal Analysis 2000.

Слично сензорним и антиоксидативним својствима испитиваних узорака чоколаде и реолошке карактеристике су одређене у временским интервалима од 0-30 дана од момента производње, и након 90, односно 180 дана. Мерења су обављена према ICA методи за мерење вискозитета какао-производа и чоколаде (*Viscosity of Cocoa and Chocolate, Analytical Method 46, 2000*) на ротационом вискозиметру са концентричним мерним цилиндром и мерном геометријом SV-DIN, модел VT550 (Visco Tester, Naake, Немачка). За интерполацију између тачака и израчунавање осталих реолошких података кориштен је математички модел по Casson-у. Резултати су приказани у виду кривих протицања (криве напона смицања и вискозитета) и табеларно. Поред тога, одређен је и статистички показатељ квалитета подударана дате једначине у виду коефицијента корелације.

Анализирани узорци чоколаде били су упаковани у идентичне амбалажне материјале, при чему је штампана лакирана алуминијумска фолија представљала примарну амбалажу (у додиру са производом), а секундарни амбалажни материјал је био сачињен од штампане папирне/картонске бланкете. На амбалажним материјалима одређена је дебљина материјала (методом *SRPS G. S2.703:1968*, мерним вијком Mikro 2000); маса по јединици површине (методом *SRPS G.S2..702:1968*); механичка својства (методом *SRPS G.S2.734:1972* на апарату INSTRON 4301); као и пропустљивост гасова (методом по Lyssy-у, према *DIN-у 53380* на апарату Lyssy GPM-200, са припадајућим гасним хроматографом Gasykyro Kogyo GC-320 и интегратором HP 3396A), те херметичност вара (1%-тним раствором родамина Б).

Сви резултати су приказани као средње вредности $\pm$ стандардне девијације. Статистичка значајност добијених разлика испитиваних параметара одређена је применом HSD Tukey – евог теста (StatSoft Statistica 10.0), истовремено за три различите врсте чоколаде (млечне и два типа црних), уз додатке различитих пробиотика (D, B, L3), укључујући и контролне узорке, током три периода складиштења (0-30, 90 и 180 дана). Изузетак су резултати оцењивања сензорног квалитета чоколаде, код који су поређена вршена само у оквири исте врсте чоколаде са додатим пробиотицима.

Поглавље **Резултати и дискусија** састоји се од 8 подпоглавља. Резултати прелиминарног огледа приказани су у првом подпоглављу. Три концентрације испитиваних пробиотика (D, B, L3) додате су у млечне и црне чоколадне масе (са 44 % и 75 % какао-делова), након чега је одређиван број живих ћелија за сваку од концентрација, а добијени резултати су приказани табеларно. Констатовано је да се применом најниже испитиване концентрације пробиотских бактерија C1 не добија довољан почетни број активних ћелија, док се додатком пробиотика у највећој

концентрацији C3 не постиже значајно повећање броја вијабилних ћелија у односу на онај број који се добија њиховим укључивањем у количини C2. Због тога је закључено да се инкорпорирањем пробиотика у концентрацији C2 обезбеђује оптималан број вијабилних ћелија у чоколадама различитог састава. Осим тога, на основу резултата сензорне анализе прелиминарних узорака утврђено је да се најбољи сензорни квалитет постиже управо додатком пробиотика у концентрацији C2, будући да се при већој концентрацији (C3) знатно чешће могла осетити зрнавоост при жвакању појединих узорака, чиме се ремети фина, глатка текстура чоколада. Због свега наведеног, одлучено је да се током главног експеримента 3 врсте пробиотских препарата укључе у 3 врсте чоколадних маса у концентрацији C2.

Један од најважнијих задатака током главног огледа који је диктирао све остале сегменте испитивања било је праћење вијабилности пробиотика у чоколадама на две температуре складиштења: 4°C и 20°C. Резултати до којих је дошао кандидат током приказаног експеримента показују да је преживљавање пробиотског соја *L. acidophilus* NCFM® (D) у различитим врстама чоколада било веома добро јер је током читавог периода складиштења од 180 дана број вијабилних ћелија наведеног соја остао на нивоу од 8 log cfu/g, односно код мањег броја узорака 7 log cfu/g, на обе испитиване температуре. На 4°C број ћелија у свим врстама чоколада је био на нивоу 8 log cfu/g до краја експеримента а разлике у броју ћелија међу врстама чоколада испољене су само у нијансама. При складиштењу на собној температури преживљавање *L. acidophilus* NCFM® (D) било у подручју 8 log cfu/g током 120 дана складиштења. Након тог периода у млечним чоколадам задржава се висок број вијабилних ћелија до самог краја испитивања, док код црних чоколада раније долази до опадања: црне чоколаде са 44 % какао-делова 180. дана складиштења имале су 9.65×10^7 активних ћелија, док је код црних чоколада са 75 % какао-делова смањење броја наступило 150. дана оставши на том нивоу до краја експеримента (5.95×10^7). Слично претходном, и пробиотски сој *B. lactis* HN019 (B) непосредно након производње је показао добру вијабилност у свим испитиваним врстама чоколада и то на нивоу 8 log cfu/g. Међутим, код наведеног соја дошло је до бржег смањења броја активних ћелија, који се после 30 дана складиштења на обе испитиване температуре спустио до нивоа 7 log cfu/g, на ком се задржао и након 90 дана. У следећем периоду испитивања, 120. дана, број вијабилних ћелија смањено се на 6 log cfu/g у свим врстама чоколада на обе температуре, што се статистички значајно разликује у односу на 5. дан складиштења ($p < 0.05$). После истека 150 дана дошло је до значајнијег редуковања броја бифидобактерија, тако да је код свих анализираних узорака чоколада утврђено смањење испод нивоа неопходног за постизање терапеутских ефеката у моменту конзумирања. Кандидат закључује да је, као последица наведеног, функционалност чоколада које садрже сој *B. lactis* HN019 (B) ограничена на период од 90 дана од момента производње. Микробиолошки статус узорака чоколада са инкорпорираним препаратом L3 био је посебно интересантан, с обзиром да наведени препарат садржи 3 микроинкапсулисане пробиотске културе (*L. acidophilus*, *S. thermophilus* и *B. breve*) које су, генерално, показале добру вијабилност током 180 дана складиштења. Посматрано појединачно, лактобацили из мешавине L3 су, као и у случају лиофилизованих култура, имали висок ниво вијабилности од 8 log cfu/g у свим чоколадама на оба режима чувања, а на бази података добијених Тукејевим тестом њихов број се није значајније мењао ни у зависности од врсте чоколаде нити са временом складиштења. Опадање стартног броја активних ћелија стрептокока из мешавине L3 (8 log cfu/g) за једну логаритамску јединицу у црним чоколадама са 44 % и 75 % какао-делова наступило је 150. дана на температури хлађења, док је на 20°C до редуковања њиховог броја дошло 120. дана, а потом поново 150. дана за још један ред величине, да би на самом крају експеримента преживљавање стерптокока било на нивоу 6 log cfu/g. Насупрот томе, у млечним чоколадама стрептококе су испољиле веома добро преживљавање које је било у подручју 8 log cfu/g, како на нижој тако и на вишој температури, током шест месеци чувања. Са друге стране, почетни број ћелија соја *B. breve* био је знатно нижи у односу на остале културе из мешавине L3 (6 log cfu/g) и остао је у наведеном подручју у свим чоколадама током 90 дана складиштења

на 4°C, као и у млечним чоколадама на 20°C, дакле на самом минимуму функционалности. У обе врсте црних чоколада на собној температури вијабилност бифидобактерија опала је са 6 на 5 log cfu/g после 30 дана складиштења. Тренд опадања ћелија *B. breve* у инкапсулисаној форми настављен је и са одмицањем времена складиштења, па је у последњем периоду испитивања (180. дана) број бифидобактерија био реда величине 3 log cfu/g у свим испитиваним узорцима чоколада. Кандидат је истакао да је, без обзира на опадање вијабилности појединих сојева (нарочито *B. breve*) у смеси L3 испод жељеног нивоа, код овог пробиотског препарата од значаја чињеница да се број ћелија може посматрати на нивоу препарата, другим речима збирно. То, практично, значи да је укупан број активних пробиотских ћелија у узорцима чоколада са инкорпорираном мешавином L3 био веома висок, и кретао се у подручју 9 log cfu/g непосредно након производње (5. дан складиштења) до 8 log cfu/g после истека 180. дана код свих анализираних врста чоколада на обе темепартуре складиштења. На тај начин чоколаде са додатом смешом култура L3 поседују функционална својства која потичу од пробиотских бактерија током читавог експеримента.

Имајући у виду да у литератури до сада нису објављени детаљнији подаци о основном хемијском саставу чоколада са пробиотицима, један од важнијих резултат до којих је дошао кандидат јесте и да додатак пробиотских бактерија, било у лиофилизованом или инкапсулисаном облику, не утиче на промену састава испитиваних узорака чоколада. Тако су садржај протеина, масти и шећера (угљених хидрата), као и израчуната енергетска вредност, били у складу са додатим сировинама у одговарајуће врсте чоколаде, независно од присуства пробиотика и без значајнијих разлика у односу на контролне узорке. Овакав резултат, мада делом очекиван с обзиром на неактивност метаболизма коришћених култура, овим истраживањем је добио своју потврду.

Утицај укључивања пробиотских култура на сензорна својства чоколада кандидат подробно испитује. Због могућности да препарати са пробиотским бактеријама поремете кристализацију какао-масти и буду окидач појаве сивљења или да својом гранулацијом измене текстуална својства, изглед, а поготово текстура чоколада са пробиотицима детаљно су испитани, као и мирис и укус због њиховог значаја и важности за прихватљивост нових производа од стране потрошача. Генерални резултат овог дела истраживања јесте да су млечне и црне чоколаде (са 44 % и 75 % какао-делова) обogaћене пробиотицима D, B и L3 имале одличан сензорни квалитет током 180 дана складиштења, са % од максималног могућег квалитета преко 90, током целокупног периода испитивања. У првом периоду испитивања (0-30 дана) највишим оценама оцењени су узорци црних чоколада са 75 % какао-делова CB (са пондерисаном средњом вредношћу оцене од 4.92), који су се одликовали сјајношћу, својственом тамном бојом, изразитом какао-аромом и добро избалансираним нотама горчине и сласти код укуса, као и својственом топивошћу. Веома блиске оцене имали су и узорци CD (4.91) из исте групе, али и узорци MLL3 (4.90) из групе млечних чоколада. Узорци млечних чоколада са додатим пробиотским препаратом L3 и после 90 дана складиштења остају у самом врху по висини додељених оцена за укупни сензорни квалитет (4.78), заједно са узорцима црних чоколада са 44 % какао-делова које су имале исту пондерисану средњу вредност оцене. Нешто ниже оцене за укупни сензорни квалитет додељене су узорцима млечних чоколада MLD ($X_{sr}=4.51$) и црних чоколада са 44 % какао-делова ($X_{sr}=4.50$) на самом крају експеримента (после 180 дана), али су још увек остали у категорији одличног квалитета. Дискутујући добијене резултате кандидат детаљно пореди оцене појединих сензорних својстава по типу чоколада повезујући их са резултатима инструменталног одређивања боје и топивости, односно реолошких карактеристика. Током оцењивања својства изгледа анализираних узорака, чланови оцењивачке комисије су као недостатке наводили углавном недовољно истиснуте мехуриће ваздуха из чоколадних табли или уочљиве трагове од калупа, много чешће него матираност површине или појаву сивљења чак и после 180 дана складиштења, што је у складу са резултатима одређивања карактеристика квалитета боје чоколада

тристимулусном колориметријом. Због састава и облика коришћених пробиотских препарата, у оквиру текстуралних својстава, оцењивана је и зрнаваост анализираних узорака чоколада у смислу њеног присуства, односно одсуства. Код узорака са појединим пробиотицима зрнаваост је констатована чешће него код других у одређеним периодима испитивања, али је, пак, у наредном периоду испитивања зрнаваост изостајала. Кандидат сматра да се наведено може објаснити нешто већом гранулацијом појединих пробиотика, као што је *Dophilus*, код којих је она и најчешће констатована, као и недовољном дисперзношћу додатих култура, будући да је њихово присуство понекад било могуће детектовати, а понекад није. Међутим, међу члановима оцењивачке комисије је постигнут консензус у погледу тога да присуство зрнавости не представља преовлађујући недостатак, односно не ремети укупни сензорни квалитет узорака чоколада са пробиотицима и не би требало да буде разлог евентуалног одбијања производа од стране потрошача. Кандидат закључује да су разлике у оценама сензорних својстава чоколада више последица њиховог различитог састава, односно врсте којој припадају по садржају основних група једињења и удела какао-делова, него додатих пробиотских бактерија, а постепено смањење оцена за поједина сензорна својства резултат уобичајених промена на чоколадама током дуготрајног складиштења.

Добијени резултати инструменталног одређивања карактеристика квалитета боје чоколада са и без пробиотика указују да се параметри квалитета боје разликују у зависности од врсте чоколаде, у смислу да имају највеће вредности код узорака млечних чоколада, ниже вредности код црних чоколада са 44 % какао-делова, а најниже код црних чоколада са 75 % какао-делова. То се, пре свега, односи на вредности средње рефлектанце (Y) и психометријске светлости (L^* и L_{Hu}) и значи да су млечне чоколаде најсветлије, а црне са 75 % какао-делова најтамније, што се лако може уочити визуелним путем. Међутим, наведено важи и за вредности осталих психометријских величина, односно тона и хроме, што је свакако теже детектовати визуелно. Мада су губитак сјаја, матираност и повећање светлости појаве које се могу очекивати током складиштења чоколаде јер претходе настанку сивљења због спонтаног преласка мање стабилних облика какао-масти у најстабилнији полиморф (β (VI)), или, још више, због увођења додатне чврсте фазе у састав чоколада инклузијом пробиотика, ове појаве нису у већој мери уочене током експеримента. Другим речима, вредности сјајности и светлости су се мењале са одмицањем времена складиштења, али без већих одступања од просека и свакако без перманентног повећања које би указало на развој појаве сивљења. Такође, кандидат је као резултат добио да су доње површине свих испитиваних узорака млечних и црних чоколада светлије од горњих, као и да су вредности присхометријских параметара условљене позицијом мерења на чоколадним таблама. Према вредностима доминантне таласне дужине (λ), а на основу дијаграма хроматичности, узорци чоколада са и без пробиотика у три периода испитивања (0-30, 90 и 180 дана) припадали су истом – наранџастом делу спектра.

Сензорно оцењивање чоколада употпуњено је и инструменталним одређивањем њихових термалних својстава применом DSC чиме се стиче бољи увид у особине топивости и кристалографску структуру, те утврђује евентуални утицај пробиотика на параметре који карактеришу ове процесе, а то су, пре свега, температуре топљења и кристализације (T_m и T_c) као и енталпије наведених процеса (ΔH_{melt} и ΔH_{cryst}). На основу дијаграма добијених током термалне анализе узорака чоколада кандидат уочава да црне чоколаде са мањим и већим процентом какао-делова имају веома сличан профил топљења са ендотермним пиковима на око 32°C, и блиским температурама почетка топљења (око 27°C). То значи да се највећи део присутне масти топи изнад собне температуре, због чега су ове чоколаде при уношењу у уста чврсте, а потом се постепено топе. За разлику од црних, при топљењу млечних чоколада уочавају се два ендотермна пика на око 24°C и 32°C, као и нижа температура почетка топљења у односу на црне чоколаде (око 21°C). Наведено значи да се један део масти отапа на температури приближној собној, чиме се објашњава карактеристична мека текстура млечних чоколада. До повећања вредности енталпије топљења и кристализације детектованог током складиштења долази због постепеног очвршћавања масти у

узорцима при стајању. Ипак, кандидат закључује да наведене промене нису таквог интензитета који би указивао на евентуалну појаву сивљења што је потврђено, како на основу вредности T_m , тако и осталим анализама испитаних чоколада (боја, сензорна анализа). Осим тога, енталпије топљења типичне за сивљење током складиштења које су наведене у литератури имале су знатно више вредности од оних до којих је дошао кандидат у овом експерименту. Што се додатка пробиотских бактерија тиче, изгледа да оне немају значајнијег утицаја на вредности енталпије топљења и кристализације (ΔH_m и ΔH_c), а свакако не доводе до њиховог повећања у односу на контролне узорке без пробиотика. Слично се уочава и на основу добијених вредности осталих параметара топљења и кристализације (T_o , T_m , T_c , T_{end}).

Пето подпоглавље у оквиру Резултата и дискусије посвећено је анализама садржаја полифенолних једињења у млечним и црним (са 44 % и 75 % какао-делова) чоколадама са и без пробиотика током 3 периода испитивања: 0-30, 90 и 180 дана. Најмањи садржај укупних фенола одређен по Folin–Ciocalteu-овој методи током целокупног експеримента имале су млечне чоколаде (узорци ML: 1.25 mg GAE/g одмашћеног узорка непосредно после производње, односно 1.34 mg GAE/g након 180 дана складиштења). Највећи садржај укупних фенола утврђен је код узорака црних чоколада са 75 % какао-делова и инкорпорираним културом *B. lactis* HN019 (CB), и то у првом периоду испитивања 9.16 mg GAE/g одмашћеног узорка, затим 8.36 mg GAE/g после 90 дана и 8.46 mg GAE/g после истека 180 дана од момента производње. Садржај укупних флавоноида у најмањем износу такође је утврђен код узорака млечних чоколада ML и током складиштења је остао готово непромењен (0.75-0.74 mg GAE/g одмашћеног узорка чоколде). Узорци CB имали су највећу количину укупних флавоноида у периоду од 0-30 дана (7.83 mg GAE/g) и 90 дана (7.28 mg GAE/g), док је у последњем периоду испитивања највећи удео укупних флавоноида нађен код узорака ML3 (7.21 mg GAE/g). Како наводи кандидат, мање количине укупних фенола и флавоноида утврђене код млечних чоколада у односу на црне, несумњиво су резултат мањег процента какао-делова у њиховом саставу (27 %), али такође могу бити последица веома комплексног састава ове врсте чоколада у којима је могуће настајање снажних интеракција између катехина и млечних протеина, што се одражава на прецизно одређивање катехина. Сличан тренд у погледу садржаја у појединим врстама чоколада могао се уочити и при одређивању присуства флаван-3-ола који су одређени ванилинским тестом и помоћу *p*-диметиламино-цинамалдехида. Млечне чоколаде имале су најмање флаван-3-ола на основу ванилин индекса (од 0.22 mg катехина/g одмашћеног узорка за узорке MLB 0-30 дана до 0.62 mg катехина/g за узорке MLD после 180 дана), следеће по садржају су биле црне са 44 % какао-делова, док су црне са вишим садржајем какао-делова очекивано имале највише флаван-3-ола (од 2.34 mg катехина/g код узорака C у првом периоду испитивања до 3.63 mg катехина/g за узорке CD после 90 дана). Када је о утврђивању флаван-3-ола помоћу *p*-диметиламино-цинамалдехида реч, примећена је иста тенденција код млечних и црних чоколада, с том разликом што су износи добијени применом овог реагенса бројчано мање од оних добијених ванилинским тестом. Током дискусије, као један од разлога томе кандидат наводи чињеницу да је *p*-DAC реагенс у стању да реагује само са хидроксилном групом у положају C-6 у бензеновом прстену, па се услед структурних разлика добијају ниже вредности применом овог есеја. Такође, истиче се да су за разлику од ванилинског теста, вредности добијене *p*-DAC-ом уједначеније између врста чоколада, као и у оквиру исте врсте са додатим пробиотицима, тако да су код неколико узорака утврђене идентичне вредности садржаја флаван-3-ола (нпр. узорци ML3 и CB 90. дана: 1.02 mg катехина/g; узорци M и MD 180. дана: 0.92 mg катехина/g, те узорци ML, MLD и MLB 180. дана: 0.16 mg катехина/g). Код млечних чоколада садржај процијанидина је био прилично уједначен за сво време испитивања и износио је у интервалу од 0.10-0.15 mg цијанидин хлорида/g одмашћеног узорка чоколаде, са изузетком узорка MLL3 код кога је 90. дана испитивања утврђен најнижи садржај ове групе полифенола у односу на све остале узорке 3 врсте чоколада: 0.09 mg цијанидин хлорида/g. Запажа се да је највиша вредност процијанидина од 1.27 mg цијанидин хлорида детектовано код узорака црне

чоколаде са 75% какао-делова СВ одмах након производње, али и код узорака црне чоколаде са 44 % какао-делова М на самом крају испитивања.

Опадајући редослед антиоксидативног капацитета екстракта чоколада одређеног FRAP и ABTS методама прати садржај укупних фенола одређених применом Folin–Ciocalteu теста: црне чоколаде са 75 % какао-делова > црне чоколаде са 44 % какао делова > млечне чоколаде. Дакле, резултати оба теста показују да црне чоколаде са 75 % какао-делова поседују највећи редукујући капацитет (од 25.37 $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ одмашћеног узорка чоколаде за узорке С 90. дана до 48.81 $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ за узорке CD 180. дана, односно од 25.41 $\mu\text{mol Trolox/g}$ одмашћеног узорка чоколаде за узорке С непосредно након производње до 39.14 $\mu\text{mol Trolox/g}$ код узорака CD 180. дана). Будући да до сада екстракти чоколада нису испитивани применом поларографске методе резултати добијени НРС есејем су били посебно интересантни и приказани су графички. Из добијених поларограма се види да висина почетне струје 5.0 mM H₂O₂ пероксида i_1 (i_{10}) опада са сваким додатком узорака чоколада. Смањење основног пика пероксида је највеће у случају црних чоколада са 75 % какао-делова које имају и највише фенолних једињења, док је у случају узорака млечних чоколада ово смањење било најмање. Кандидат је утврдио да нема разлике у АО активности у оквиру исте врсте чоколада без обзира на додате пробиотице, као и да нема значајнијих разлика по временској координати. У циљу потпунијег сагледавања укупног АО капацитета обављено је утврђивање оксидативне стабилности масти екстрахованих из узорака чоколада са и без пробиотика методом DSC. Добијени резултати указују да црне чоколаде са 44 % какао-делова имају у просеку 4 пута дуже индукционо време оксидације (OIT) у односу на млечне, а нешто изнад 1.5 пут краће OIT у поређењу са црним чоколадама са 75 % какао-делова. Маст екстрахована из црних чоколада са највише какао-делова одолеће оксидационим променама у просеку чак 6.5 пута дуже од масти из млечних чоколада. Иако су разлике у вредностима температуре почетка оксидације (OOT) међу анализираним чоколадама мање изражене, евидентно је да се са повећањем какао-делова повећава и температура на којој започињу оксидационе промене, без обзира да ли се ради о узорцима са пробиотикима или без њих. Кандидат је обавио и поређења резултата садржаја укупних и појединачних класа фенола са примењеним методама за утврђивање АО капацитета, као и са оксидативном стабилношћу масти, и добио веома високе коефицијенте корелације, нарочито између АО есеја и садржаја полифенола, што, поред осталог, сугерише да се нова поларографска метода може успешно примењивати и на какао-производе.

У седмом подпоглављу дати су резултати реолошких мерења који су приказани табеларно и графички. Генерално, реолошки параметри анализираних узорака се разликују, пре свега, према врсти чоколада. Вредности пластичног и привидног вискозитет су биле у уским границама у оквиру исте врсте чоколада, са најмањим износима код црних чоколада са 75 % какао-делова, углавном због већег садржаја масти која обавија чврсте честице и омогућава лакше протицање. Млечне чоколаде су биле вискозније због присуства веома ситних честица млека у праху, док су црне са 44 % какао-делова по вредностима реолошких параметара биле између остале две врсте. Према подацима добијеним Tukey-евим тестом евидентно је да су се приносни напон, пластични и привидни вискозите по износима најмање разликовали међу узорцима црних чоколада са 75 % какао-делова код којих готово да и нема варирања између контролних узорака и оних са додатим пробиотикима. Тек нешто веће разлике уочавају се у групи црних чоколада са 44 % какао-делова, док су најизраженије разлике присутне код млечних чоколада, што се у већој или мањој мери, испољава у свим периодима испитивања. Кандидат запажа да је инклузија пробиотских бактерија имала већи утицај на приносни напон, који представља више одраз сила између чврстих честица, него на пластични и привидни вискозитет, који нису претрпели веће промене. Због тога је додатак ових компонената, као нове дисперзне фазе, условио повећање међучестићних интеракција и, последично, повећање енергије која је потребна за почетак протицања чоколадне масе. Иако наведена појава није представљала правило, била је уочљива код оних пробиотских препарата који су имали већу гранулацију

(какав је рецимо D), као и код оних врста чоколада које су имале мањи садржај масти који би компензовао повећање удела чврсте фазе. Илустративан пример за то су узорци црне чоколаде са 44 % какао-делова MD после 180 дана складиштења код којих је уочен изразити скок приносне вредности и приметнија одступања на кривој протицања, а који спадају у групу узорака са најмањим укупним садржајем масти. Кандидат сматра да се ове спорадичне промене приносног напона могу повезати са начином дисперговања пробиотских култура тј. хомогеношћу узорака чоколада са пробиотицима, које би било потребно модификовати и усавршити. Такође је наглашена добра корелација резултата реолошких мерења са резултатима сензорног оцењивања чоколада, будући да су они узорци који су имали веће вредности приносног напона добијали ниже оцене за механичка и геометријска својства текстуре.

Добијени резултати за физичко-механичка и баријерна својства амбалажних материјала показују да су они задовољили у погледу свих испитиваних параметара, осим у погледу херметичности вара, јер је методом микропорозности констатовано да су сви варови нехерметични на позицији углава. Кандидат је овај недостатак препознао као један од фактора са потенцијалним утицајем на функционалност чоколада са пробиотицима, с обзиром на могући контакт финалних производа са ваздушним кисеоником.

На основу прегледа, анализе и дискусије експериментално утврђених резултата, кандидат је у поглављу **Закључци** дефинисао више конкретних, јасних и корисних закључака, међу којима издвајамо важније:

- Прелиминарним огледом спроведеним у оквиру приказане докторске дисертације установљене су оптималне концентрације различитих пробиотика, које обезбеђују добијање функционалног производа са довољним бројем вијабилних ћелија и одличан сензорни квалитет различитих врста чоколада;
- Вијабилност пробиотика у лиофилизованом и микроинкапулисаној форми у млечним и црним (са 44 % и 75 % какао-делова) чоколадама, без обзира на опадање са временом је, генерално, била добра на обе посматране температуре (4°C и 20°C) током 180 дана складиштења. У том погледу најбоље резултате показала је микроинкапулисана мешавина пробиотских култура L3 са бројем ћелија на нивоу 9-8 log cfu/g, праћена лиофилованим сојем *L. acidophilus* NCFM® (D) чије су се ћелије одржале у подручју од 8 log cfu/g за време читавог експеримента, задржавши функционалност током 180 дана складиштења. Најбржи тренд опадања испољио је пробиотски сој *B. lactis* HN019 (B) чији је број са почетних 8 log cfu/g опао на 6 log cfu/g после 90 дана складиштења, ограничавајући тиме и рок функционалности чоколада које га садрже на наведени временски период. Приказано истраживање пружио је потврду да се чоколаде са пробиотицима могу складиштити и на собној температури без бојазни од драстичног пада функционалности производа. Наведено је од посебног значаја за трговце и потрошаче, с обзиром да се чоколаде и чувају на амбијенталној температури знатно чешће него на температури хлађења;
- На основу резултата оцењивања сензорних својстава сви испитивани узорци млечних и црних чоколада са пробиотицима припадали су категорији одличног квалитета током 180 дана складиштења. Додати пробиотици нису узроковали појаву сивљења, нити су довели до настанка страног и несвојственог мириса и укуса чоколада. Од текстуралних својстава најчешће су била измењена геометријска својства, због појаве зрнавости код одређених узорака у појединим периодима испитивања, која се, ипак, не може сматрати пресудним недостатком за неприхватање производа. Вредности средње рефлектанце (Y %) и психометријске светлости (L^* и L_{Hb}) одређене тристимулусном колориметријом нису се перманентно повећавале током времена нити су значајније вариране између узорака са пробиотицима и контролних, на основу чега се закључује да није регистрована појава сивљења при додатку пробиотика у чоколаде, а овако добијени резултати показују добру сагласност са

оцењивањем сензорног квалитета и омогућавају прецизно праћење и најмањих промена боје. Анализа термалних својстава пружила је доказе да није дошло до промене својстава топивости чоколада са пробиотицима у односу на оне које их не садрже, с обзиром да нису уочене значајније разлике у вредностима енталпије (ΔH_m , ΔH_c) и осталих термодинамичких параметара топљења и кристализације (T_o , T_m , T_c , T_{end}), а примећене разлике потичу од састава млечних и црних (са 44 % и 75 % какао-делова) чоколада, пре свега, од њиховог садржаја масти;

- Пробиотске бактерије нису испољиле уочљиво дејство на садржај укупних и појединачних класа фенола, нити су довеле до ремећења АО потенцијала чоколаде у које су додате. На бази високих коефицијената корелације HPS методе са FRAP и ABTS методама, као и са садржајем полифенолних једињења, потврђена је њена валидност и могућност примене на какао-производе. Обогаћивање млечних и црних чоколада пробиотицима није испољило негативно дејство на оксидациону стабилност из њих екстрахованих масти;
- Испитиване пробиотске бактерије нису довеле до измене реолошких параметара чоколада у значајнијој мери. У свим периодима испитивања добијени су високи коефицијенти корелације са Casson-овим моделом протицања а вредности реолошких параметара су, углавном, одговарале типу чоколада. Вредности пластичног и привидног вискозитета нису претрпеле осетније промене, како у оквиру исте врсте чоколада (са и без додатих пробиотских култура), тако ни током времена. Повећање вредности приносног напона, констатовано у одређеним случајевима, се може приписати гранулацији поједних пробиотских препарата и њиховом утицају на начин паковања честица, као и недовољној хомогености узорака која је погодовала агрегацији честица. Примена ефикаснијих техника дисперговања и прилагођавање расподеле честица по величини би смањило могућност одступања у вредностима приносног напона.
- Нехерметичност вара на примарном амбалажном материјалу може бити један од могућих узрока опадања вијабилности појединих пробиотика у различитим врстама чоколада, што се посебно односи на бифидобактерије;
- Приказаним истраживањем доказано је да су чоколаде добар матрикс за интестиналну доставу пробиотика, а због обједињених добробити пробиотика и полифенолних једињења представљају нов производ са функционалним својствима.

У оквиру поглавља **Литература** наведене су 423 библиографске јединице (од који су 134 објављене у последњих 5 година), углавном иностраних, али и релевантних домаћих аутора, које су одабране тако да на врло докуметован начин пружају слику о широкој проблематици која је овом докторском дисертацијом обрађена.

3. Закључак и предлог

На основу извршене анализе урађене докторске дисертације мр Јованке Лаличић-Петронијевић под насловом **"СЕНЗОРНА, АНТИОКСИДАТИВНА И РЕОЛОШКА СВОЈСТВА РАЗЛИЧИТИХ ВРСТА ЧОКОЛАДА СА ПРОБИОТИЦИМА"** Комисија оцењује да она представља успешно урађен, самосталан, експериментално-истраживачки и оригиналан научни рад. У приказаним истраживањима утврђени програм докторске дисертације у потпуности је реализован. Примењујући одговарајуће, савремене методе и технике, мр Јованка Лаличић-Петронијевић је у оквиру постављеног циља и програма рада веома успешно обавила експериментални део истраживања, што је и документовано у резултатима дисертације. Један од кључних резултата приказаног рада представља утврђивање оптималне концентрације пробиотских бактерија која обезбеђује довољан број вијабилних ћелија и одговарајући сензорни квалитет млечних и црних (са 44 % и 75 % какао-делова) чоколада, и то: *L. acidophilus* NCFM® - 3.50 g/kg, *B. lactis* HN019 - 1.75 g/kg, DUOLAC MIX L3 - 3.50 g/kg

чоколадне масе. Вијабилност микроинкапсулисане мешавине култура L3 у испитиваним узорцима чоколада била је на нивоу $9-8 \log \text{ cfu/g}$, а лиофилизованог соја *L. acidophilus* NCFM® $8 \log \text{ cfu/g}$, током целокупног експеримента на обе посматране температуре чувања (4°C и 20°C), услед чега су чоколаде које их садрже имале функционална својства која потичу од пробиотика током 180 дана складиштења. Број активних ћелија *B. lactis* HN019 је са почетних $8 \log \text{ cfu/g}$ после 90 дана складиштења опао на $6 \log \text{ cfu/g}$, због чега је и трајност различитих врста чоколада обogaћених наведеном културом краћи у односу на преостала два препарата. Разлике у броју активних ћелија међу врстама чоколада испољене су само у нијансама. Сви анализирани узорци млечних и црних чоколада имали су одличан сензорни квалитет током шестомесечног складиштења са средњом пондерисаном вредношћу оцене у подручју од 4.50 (узорци MD 180. дана испитивања) до 4.92 (узорци СВ у периоду од 0-30 дана). Одликовали су се својственим изгледом и бојом, без појаве сивљења, добрим текстуалним својствима, одговарајућом топивошћу и карактеристичном аромом. Од великог значаја је и податак да инкорпорирање пробиотских бактерија у утврђеним концентрацијама не доводи до ремећења садржаја полифенолних компонената чоколада и њиховог антиоксидативног капацитета, као ни реолошких параметара црних и млечних чоколадних маса, што такође представља важан резултат проистекао из приказане докторске дисертације. Дискусија резултата вођена је аргументовано, уз поређење добијених резултата са резултатима до којих су дошли други аутори. Закључци су такође добро изведени и у сагласности су са добијеним резултатима и дискусијом. Дисертација је прегледна, писана јасним језиком, а технички је веома добро организована и опремљена.

Комисија сматра да приказана дисертација представља заокружену научну целину проучавања примене пробиотских бактерија у чоколаде различитог састава, која је резултирала добијањем нових производа са додатом вредношћу код којих су терапеутски ефекти пробиотика и благодети полифенолних компонената интегрисани на једном месту. Проблематика коју је кандидат одабрао, експериментално испитао и обрадио у поднетој дисертацији је веома актуелна и у складу са треновима савремене исхране, а добијени резултати и њихово тумачење представљају запажен допринос науци и пракси.

Имајући у виду све наведене констатације, Комисија позитивно оцењује урађену докторску дисертацију мр Јованке Лаличић-Петронијевић под насловом **"СЕНЗОРНА, АНТИОКСИДАТИВНА И РЕОЛОШКА СВОЈСТВА РАЗЛИЧИТИХ ВРСТА ЧОКОЛАДА СА ПРОБИОТИЦИМА"** и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати ову позитивну оцену и позове кандидата да је јавно брани.

У Београду, 01.11.2012. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Јованка Попов-Раљић, редовни професор
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
и Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

Др Драгојло Обрадовић, редовни професор у пензији
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

Др Зорица Радуловић, ванредни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

Др Драженка Комес, ванредни професор
Прехрамбено-биотехнолошки факултет, Универзитет у Загребу

Др Радомир Радовановић, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

Др Виктор Недовић, редовни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду

Прилог:

Радови кандидата објављени у часописима са SCI листе:

1. Jovanka Popov-Raljić, **Jovanka Laličić-Petronijević** (2009). Sensory Properties and Color Measurements of Dietary Chocolates with different Composition During Storage for Up to 360 days. *Sensors*, 9 (3), 1996-2016; doi:[10.3390/s90301996](https://doi.org/10.3390/s90301996) ISSN: 1424-8220.
2. Jovanka Popov-Raljić, **Jovanka Laličić-Petronijević**, Aneta Georgijev, Vladimir Popov, Mića Mladenović (2010). Sensory Evaluation of Pralines Containing Different Honey Products. *Sensors* 10 (9), 7913-7933; doi:[10.3390/s100907913](https://doi.org/10.3390/s100907913) ISSN: 1424-8220.

Ментор

Др Јованка Попов-Раљић,
редовни професор