

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 461/8-7.5.
Датум: 24.05.2017.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. став. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12 и 172/13), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

Кандидат **САША (Миленко) ДЕСПОТОВИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавио је докторску дисертацију под називом: "Биолошка и функционална својства пива са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*",

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 13.07.2016. године, својим актом број 61206-3557/2-16, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: "**Биохемијска и функционална својства пива са додатком гљиве *Ganoderma lucidum***".

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 21.12.2016. године, одлуком Факултета број 461/3-5.1, у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Ида Лескошек-Чукаловић, редовни професор, Наука о врењу, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Виктор Недовић, редовни професор, Наука о врењу, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Миомир Никшић, редовни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
4. др Љиљана Гојковић-Букарица, редовни професор, Клиничка фармакологија и токсикологија, Универзитет у Београду - Медицински факултет,
5. др Мирјана Пешић, ванредни професор, Биохемија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
6. др Јелена Пејин, ванредни професор, Биотехнологија, Универзитет у Новом Саду - Технолошки факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 24.05.2017. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 461/8-7.5.
Датум: 24.05.2017. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 38. Правилника о правилима академских студија другог и трећег степена, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 24.05.2017. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднео **САША ДЕСПОТОВИЋ, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«БИОХЕМИЈСКА И ФУНКЦИОНАЛНА СВОЈСТВА ПИВА СА ДОДАТКОМ ГЉИВЕ *Ganoderma lucidum*».**

II Универзитет је дана 13.07.2016. године, својим актом број 61206-3557/2-16, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Leskošek-Čukalović I., **Despotović S.**, Lakić N., Nikšić M., Nedović V., Tešević V., (2010): *Ganoderma lucidum* - medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties, Food Research International, 43 (9), 2262-2269.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Иди Лескошек - Чукаловић, редовном професору, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

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

Датум: 31.03.2017. године

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Саше Деспотовић, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 461/3-5.1 од 21.12.2016. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: «Биохемијска и функционална својства пива са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*», кандидата Саше Деспотовић, дипл. инж. Након што смо детаљно проучили урађену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Саше Деспотовић, написана је на 264 страна текста и укључује 69 табела и 52 слике. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику. Докторска дисертација садржи седам поглавља, и то: Увод (стр. 1 - 2), Преглед литературе (стр. 3 - 71), Циљеви истраживања (стр. 72), Експериментални део (стр. 73 - 86), Резултати и Дискусија (стр. 87 - 189), Закључак (стр. 190 - 198) и Литература (стр. 199 - 264). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата и обавезне изјаве. Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је дат осврт на глобалне трендове у производњи пива, са посебним акцентом на специјалне врсте пива. Наведени су најважнији састојци пива са аспекта биолошког дејства на организам. Након тога дат је осврт на употребу гљива кроз историју, истакнуто је глобално интересовање за употребу медицинских гљива у традиционалној и савременој медицини. Истакнути су фармаколошки ефекти гљиве *Ganoderma lucidum* и презентована је идеја о могућности употребе ове гљиве у добијању специјалних пива.

Преглед литературе. У *Прегледу литературе* који има три потпоглавља детаљно су обрађени доступни литерарни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу *Функционална храна* кандидат се осврнуо на концепт функционалне хране, дао кратак историјат развоја и настанка назива „функционална храна“ са посебним освртом на законодавну регулативу у свету. Дат је преглед биоактивних једињења како би се разумели механизми по којима потенцијална функционална храна или њене компоненте функционишу. У последњем делу, овог потпоглавља, кандидат даје приказ стања тржишта функционалне хране у свету. У другом потпоглављу *Ganoderma lucidum* детаљно је описан хемијски састав гљиве, са посебним акцентом на полисахариде, који представљају најдоминантнију групу једињења присутних у гљиви, и тритерпене који представљају

главну групу секундарних метаболита. Кандидат врло детаљно описује терапеутску примену *G. lucidum* полазећи од њених антиоксидативних карактеристика, са посебним акцентом на антиканцерогена својства. Изложено је неколико теорија о механизму деловања гљиве на карцином, и дат велики број података о спроведеним клиничким *in vivo* и *in vitro* студијама. Истакнута су антимикробна и антипаразитска својства, као и ефекат *G. lucidum* на кардиоваскуларни, ендокрини и нервни систем са посебним освртом на токсичност. У потпоглављу *Пиво* сажето је дата историја настанка и развоја пиварства до данашњих дана. Описана су пива са специфичним сензорним својствима, као и она намењена циљној групи потрошача са специфичним захтевима у погледу начина исхране. Кандидат је изложио тренутно стање у погледу производње и потрошње пива у свету, и тренутним трендовима. Детаљно је приказан хемијски састав пива, а потом су концизно изложени здравствени аспекти конзумирања пива.

Циљеви истраживања. Циљ ове дисертације је добијање специјалног пива повећаних функционалних својстава додатком гљиве *Ganoderma lucidum*, а који укључује: **а)** испитивање услова алкохолне екстракције гљиве у циљу добијања стандардизованог екстракта оптималног квалитета; **б)** хемијска карактеризација, утврђивање антиоксидативних и антимикробних својстава добијеног екстракта; **в)** утврђивање оптималних услова ферментације и начина додавања гљиве како би се добило пиво са најприхватљивијим сензорним карактеристикама; **г)** физичко-хемијска карактеризација добијеног производа; **д)** утврђивање антиоксидативних и антимикробних својстава добијеног пива; **ђ)** сензорна анализа добијеног пива у оквиру различитих група потрошача; **е)** *in vivo* и *in vitro* испитивања постигнутих ефеката анализом утицаја добијеног производа на кардиоваскуларни систем.

Експериментални део. Обухвата детаљан опис коришћених материјала, примењеног технолошког процеса производње специјалних пива и аналитичких метода које су спроведене у циљу физичко-хемијске, сензорне и функционалне карактеризације добијених пива. У *Експерименталном делу* постоје два поглавља. У првом потпоглављу, *Материјал*, дат је преглед коришћених хемикалија и сировина. У другом потпоглављу, *Метод*, дат је детаљан опис примењених метода. Извршена је анализа плодносног тела гљиве на садржај азотних материја, протеина, пепела, масти и угљених хидрата АОАС аналитичким методама, док је активност воде одређена на уређају Novasina Thermoconstanter ТН-2. Подробно је описана припрема екстракта гљиве употребом воде и етанола (40% v/v i 70% v/v) као екстрактаната, ултразвучног (45 kHz i 60 kHz) и термичког третмана, и различитих дезинтеграционих поступака. Производња пива на бази гљиве *G. lucidum* спроведена је на два начина. I - додавањем различитих количина гљиве и екстракта у охмељену сладовину, уз употребу квасца *Saccharomyces pastorianus*, при температури од $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$, код примарне ферментације, односно $1 \pm 2^{\circ}\text{C}$ у току одлежавања. II – додавањем различитих количина екстракта *G. lucidum* у готов производ. Одређивање физичко-хемијских параметара пива обухватало је: одређивање садржаја алкохола, правог и привидног екстракта, правог и привидног степена преврелости, као и енергетске вредности уз помоћ *Alcolyzer Beer ME Analyzing System*-а, одређивање боје, горчине, pH вредности и садржаја CO_2 методама по *Analytica-EBC*, и одређивање боје ручним хромометром CR-410 (Minolta, Ramsey, NJ), са извором светлости D₆₅. Укупни феноли су одређени методом по *Folin-Ciocalteu*-у, док је антиоксидативни потенцијал, свих добијених узорака, одређен употребом DPPH, FRAP i ABTS^{*+} теста. Одређивање садржаја глукана извршено је уз помоћ специфичног ензимског кита „Mushroom and Yeast β -glucan Assay", K-YBGL 09/2009 (Megazyme Int., Wicklow, Ирска). Квалитативна анализа

фенолних једињења испитана је LC-MS техником, док је квантитативни садржај полифенолних материја испитан HPLC методом уз примену екстерних стандарда (рутин, нарингенин, хлорогенска киселина, *транс*-цинаминска киселина, кверцетин, *пара*-кумаринска киселина, кофеинска киселина, *пара*-хидроксибензоева киселина, сиригинска киселина, ванилинска киселина, ресвератрол, кемпферол, хесперетин, катехин, бензоева киселина и гална киселина). FT-IR анализа извршена је техником пригушене укупне рефлексије. ^1H NMR (200 MHz) спектри су снимљени помоћу Varian Gemini 2000 спектрометра. Методом гасне хроматографије у узорцима су квантификована следећа испарљива једињења: ацеталдехид, изоамилацетат, етил-ацетат, етил-пропионат, *n*-пропанол, изобутанол, амилалкохоли, диметил сулфид, диацетил и 2,3-пентандион. Анализа је вршена са гасним хроматографом Perkin Elmer тип Clarus 500 са уређајем за аутоматско узимање узорака Turbomatrix 40, док је раздвајање једињења обављано употребом две колоне: Elite-5 и Elite-WAX (Perkin Elmer). GC-MS анализа је извршена на апарату Agilent 7890A са MS-детектором Agilent 5975C уз употребу колоне Agilent 19091N-30 m x 320 μm x 0.25 μm са поларном течном фазом HP-INNOWax (полиетиленгликол). Сензорна анализа пива обављена је од стране потрошача у складу са препорукама Analytica EBC и МЕВАК (EBC 13-13.3; МЕВАК 1-1.8; МЕВАК 4.5.2.1). Дескриптивна сензорна анализа је спроведена са пет обучених оцењивача како би се добио шематски опис сензорних карактеристика пива у виду радар дијаграма, користећи следеће методе: EBC 13.10; 13.12; 13.13; и МЕВАК 1.6; 2.1-2.4; 3.2.1-2. Антимикробна својства су утврђена одређивањем минималне инхибиторне концентрације и минималне бактерицидне концентрације, екстракта и пива, коришћењем Microplate BioTek, ELx808 читача. Одређивање цитотоксичности је извршено на: ћелије хуманог меланома (FemX), ћелије аденокарцинома плућа (A549), ћелије хуманог карцинома грлића материце (HeLa) и трансформисане епителијалне хумане соматске ћелије (EA.hy 926). Фармаколошко *in vivo* испитивање извршено је коришћењем лабораторијских пацова, где су се испитивала дејства добијених пива произведених са додатком *Ganoderma lucidum* на кардиоваскуларне функције пацова и поређење са контролним пивом, водом и алкохолом. У другој студији извршено је испитивање утицаја пива са екстрактом *Ganoderma lucidum* на крвни притисак, срчану фреквенцу, QT и RR интервала срца код мушкараца млађе старосне доби. Сва испитивања су била обављена у складу са захтевима Етичког комитета Медицинског факултета у Београду. Статистичка обрада података је извршена употребом Statistica програма верзија 12 (Statistica, Tulsa, OK, SAD), SPSS програма, верзија 20 (SPSS Inc, Chicago, IL, SAD) и Biplot excel makro-a (Ilya A. Lipkovich, Eric P. Smith, 2002).

Резултати и дискусија. Резултати истраживања обрађени су у оквиру шест потпоглавља, написани су концизно и јасно и документовани прегледним табелама. Продискутовани су на адекватан начин уз графичку и статистичку обраду добијених вредности и упоређени са резултатима сличних истраживања код нас и у свету. У првом потпоглављу *Хемијски састав гљиве Ganoderma lucidum* приказани су резултати анализе основног састава гљиве, тј. азотних материја (1,74 g/100g), протеина (10,90 g/100g), масти (2,68 g/100g), угљених хидрата (82,62 g/100g), пепела (2,93%) и a_w (0,34) вредности. У другом потпоглављу *Анализа екстракта Ganoderma lucidum* извршена је детаљна анализа произведених екстракта гљиве. Утврђен је утицај начина екстракције на количину азотних материја, масти, угљених хидрата, фенолних материја, приноса и извршена је сензорна оцена добијених екстракта. Сви резултати су приказани табеларно и путем бокс-плота, док су разлике анализиране коришћењем Такијевог теста. Утврђено је да је количина азотних материја била највећа код воденог екстракта добијеног термичким третманом и применом

ултразвука од 60 kHz, док је код етанолних екстраката то био узорак добијен екстракцијом 70% v/v етанола и ултразвука од 60 kHz. Количина масти је била већа код алкохолних екстраката, насупрот садржају угљених хидрата чије вредности су биле знатно ниже у односу на водене. У погледу добијања што већег садржаја полифенолних материја утврђено је да се садржај полифенолних материја значајно повећава са повећањем дезинтеграције гљиве, вода се није показала као погодан екстрактант, док се са повећањем концентрације етанола повећао и садржај ових материја. Резултати спроведених анализа су приказани, помоћу *bi-plot* дијаграма који су омогућили истовремено приказивање информација узорака и варијабли матрице, како би се утврдила корелациона зависност. Путем кластер анализе извршено је груписање екстраката по варијаблама и количини присутних материја у појединачним узорцима, што је и послужило као основа за одабир мањег броја узорака за даљу анализу. Анализом садржаја глукана утврђено је да коришћењем алкохолне екстракције и ултразвучног третмана не долази до значајних промена при екстракцији α -глукана. Ипак, овај третман има значајан утицај на садржај укупних и β -глукана, било да се екстракција врши водом или етанолом. Утврђено је и да, када су у питању β -глюкани, водена екстракција има предност над алкохолном. Садржај α -глукана и код алкохолних и водених екстраката се кретао око 1,76 g/100g екстраката, док је садржај β -глукана био у границама од 18,72 до 20,91 g/100g (алкохолних) екстракта, и 55,46 до 60,14 g/100g (водених) екстракта. Антимикробна својства су испитана на патогене бактерије (*Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* и *Listeria monocytogenes*) и узročнике микробиолошког кварења пива (*Geobacillus stearothermophilus*, *Pediococcus cerevisiae*, *Megasphaera cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* и *Pectinatus cerevisiiphilus*) при чему су утврђене минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације. Најјачи ефекат испољен је према *Listeria monocytogenes* > *Yersinia enterocolitica* > *E. coli* O157:H7, у случају патогених, а најмањи код *Geobacillus stearothermophilus*. Цитотоксичност је утврђена код свих анализираних екстраката, међутим јачи ефекат су имали алкохолни екстракти, који су у првих 24 часа довели до апоптозе FemX ћелије меланома у концентрацијама од $110,5 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$ до $250,7 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$.

Даљим испитивањем утврђено је деловање екстракта добијеног екстракцијом са 70% v/v етанолом и ултразвучним третманом од 60 kHz, на ћелијске линије аденокарцинома хуманог цервикса, плућа и на хибрид хуманих соматских ћелија. Највећи ефекат забележен је на HeLa ћелијама након 48 часова ($123,8 \pm 8,4 \mu\text{g/ml}$). Анализом антиоксидативног потенцијала и укупних полифенола изабраних екстраката, даје се предност алкохолним екстрактима. HPLC анализом константован је већи садржај полифенолних компоненти код етанолних него код водених екстраката. Код узорка добијеног алкохолном екстракцијом са 70% етанолом, детектовано је девет од шеснаест полифенола, при чему је највећи садржај био за нарингенин ($8,10 \mu\text{g/l}$), хесперетин ($5,53 \mu\text{g/l}$), катехин ($4,93 \mu\text{g/l}$) и ванилинску киселину ($2,06 \mu\text{g/l}$). У свим осталим узорцима, установљене су знатно ниже количине. У воденим екстрактима примећен је недостатак *p*-хидроксибензојеве киселине, а у етанолним кемпферола. Присуство галне, кофеинске, бензојеве и хлорогенске киселине, као и рутина и ресвератола, није детектовано ни у једном узорку. На бази LC-MS анализе констатовано је да су се, као најдоминантније компоненте код екстраката, издвојиле ганодеринске киселине А, Д и Г, док је садржај ганодеринских киселина Ц и Б био нешто нижи, а свих детектованих значајно већи код екстракта добијеног алкохолном екстракцијом (изузев у случају луциденских киселина ЛМ₁, Е и Д₂). Количина 12-хидрокси-ганодеринске киселине није се битно разликовала у узорцима. Утврђено је и присуство јако (ганодеринске киселине А, Ј и луциденске

киселине А) и умерено (ганодеринске киселине Б и Ц₂) горких тритерпена. Анализом добијеног пива на бази гљиве *Ganoderma lucidum* детектоване су ганодеринске киселине А, В, D, G и H, ганодеринске киселине Е, Ц₆, Ф, J и луцидинска киселина ЛМ₁ у траговима, док су ганодеринска киселина Ц₂, луцидинска киселина Е и ганодерманотриол недостајали у узорку. Протонском NMR спектроскопијом узорка добијеног алкохолном екстракцијом са 70% етанолом потврђено је присуство терпенских компоненти (ганодеринске киселине), аминокиселина, масних киселина, угљених хидрата и тритерпенских киселина, ароматичних аминокиселина, нуклеозида, ароматичних алкохола и полифенолних једињења. Анализа FT-IR спектра потврдила је присуство карактеристичних апсорпционих трака које одговарају структурама типичним за присуство α- и β-гликозидних веза, β-глюкана, протеина, полисахарида и полифенола у екстракту добијеном алкохолном екстракцијом са 70% етанолом. У трећем потпоглављу *Поступци добијања пива са Ganoderma lucidum и сензорна оцена добијених пива* утврђено је да *Ganoderma lucidum*, додата у облику уситњеног плодносног тела, екстракта или њиховом комбинацијом, у различитим фазама технолошког поступка производње није имала значајни утицај на пораст биомасе употребљеног квасца, као ни брзину ферментације. Од испитаних технолошких поступака производње пива на бази гљиве *Ganoderma lucidum*, као најпогоднији показао се онај са додавањем екстракта након филтрације, тј. у готов производ. Сензорном анализом утврђено је да потрошачи не примећују разлике између добијених пива, што значи да коришћење датих количина плодносног тела и екстракта у поступку ферментације даје сличне сензорне резултате. Додавањем екстракта у количинама од 0,5 и 1,0 ml/l добија се пиво са приближно истим карактеристикама као полазно пиво, док су веће количине, од 3,0 и 4,5 ml/l, довеле до лошијих сензорних карактеристика, посебно у погледу горчине и допадљивости узорка. Пиву на бази *Ganoderma lucidum* и мушкарци и жене су дали идентичне оцене као стандардном у погледу свежине, али и битно другачије по питању пуноће укуса, и нарочито ароме, укуса, горчине и општег утиска. Утврђено је да између мушких и женских потрошача постоје разлике у оцени допадљивости испитиваних пива, док су остали параметри слично оцењени. Сензорни профил пива са екстрактом *Ganoderma lucidum* значајно се разликовао од стандардног, међутим у сензорном профилу безалкохолних пива са додатком екстракта *Ganoderma lucidum* добија се пиће хармоничног и заокруженог укуса, које више подсећа на стандардно пиво. Сладни укус, медна нота и слаткоћа значајно су ублажени. У четвртном потпоглављу *Хемијска карактеризација пива* анализирани су основни параметри квалитета пива, при чему је утврђен позитиван ефекат гљиве на трајност пене, и површину коју заузимају пива у чаши. Постиже се бољи ефекат од 15 % код стандардних и 19,2 % код безалкохолних пива. HPLC анализом безалкохолног пива и пива са *Ganoderma lucidum* утврђена је слична количина фенолних једињења, сем код *p*-хидроксибензојеве, бензојеве, ванилинске киселине и сиригинске киселине, у којима је дошло до повећања за 0,10mg/l, 0,12 mg/l, 0,27 mg/l, и 0,15 mg/l, респективно. LC-MS анализом добијеног пива на бази гљиве *Ganoderma lucidum* детектоване су ганодеринске киселине А, Б, Д, Г и Х, ганодеринске киселине Е, Ц₆, Ф, J и луцидинска киселина ЛМ₁ у траговима, док ганодеринска киселина Ц₂, луцидинска киселина Е и ганодерманотриол нису детектоване. Спектрални профили добијени NMR анализом полазног и обогаћеног пива узорка веома су слични. Уочене су мале промене у свим регионима у релативној пропорцији пикова. Детектовано је присуство ферментабилних шећера, декстрина и терпенских једињења. На FT-IR спектру добијених пива уочене траке одговарају спектралним тракама, које потичу од екстракта *Ganoderma lucidum*. У петом потпоглављу *Фармаколошка и антимикробна*

својства пива на бази гљиве *Ganoderma lucidum* утврђено је да безалкохолно пиво, у односу на контролно, има повећано микробистатичко деловање према свим испитиваним микроорганизмима (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus brevis*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Geobacillus Stearothermophilus*, *Megasphaera cerevisiae*). Цитотоксични ефекат безалкохолног пива обогаћеног испитиваним количинама екстракта није имао ефекта на одабране ћелијске линије, али је зато три пута већа концентрација екстракта, у пиву, дала позитивне резултате након 48 часова. Најјаче дејство испољено је према HeLa хуманим епителним ћелијама цервикса, а нешто слабије према FemX хуманом меланому. Ћелије аденокарцинома плућа (A549) су, након 48 часова, редуковане за 50% услед изазване апоптозе у концентрацији од 927 µg/ml. Испитивањем утицаја алкохола, пива и пива са екстрактом *Ganoderma lucidum* на крвни притисак и срчану фреквенцу пацова, установљено је да обогаћено пиво након десетог минута доводи до константног и уједначеног пада срчане фреквенције. Након четрдесетог минута, јавила се статистички значајна разлика у паду притиска пацова третираних пивом са екстрактом *Ganoderma lucidum* и осталих узорака, све до 105-ог минута, након чега се та разлика смањила. Евидентно је и да етанол није одговоран за овакве резултате, већ одређене биоактивне компоненте екстракта *Ganoderma lucidum*. Истраживањем утицаја пива са екстрактом *Ganoderma lucidum* на крвни притисак и срчану фреквенцу мушкараца млађе старосне доби утврђено је да, након конзумирања, контроле и пива, долази до наглог скока броја откуцаја срца, дијастолног и систолног крвног притиска. После десет минута, њихове вредности се враћају на почетни ниво. У погледу срчане фреквенце није било разлике међу испитаницима, док је након двадесетог минута дошло до пада систолног и дијастолног притиска приликом конзумирања пива са *Ganoderma lucidum* (у односу на контролу). Међутим, у оквиру групе неконзумента запажене су значајне разлике од двадесетог до педесетог минута за систолни и далеко уочљивије разлике за дијастолни крвни притисак. Код срчане фреквенце, нису забележене статистички значајне разлике ни у једном сегменту. На основу испитивања утицаја пива са екстрактом *Ganoderma lucidum* на QT и RR интервал уочено је да је QT варијабилност била значајно повећана након конзумирања пива са екстрактом *Ganoderma lucidum*, након чега се вратила у нормалу. Структура QT интервалних серија била је различита од RR серија у фази релаксације, при чему је пиво имало различита дејства на ове две серије. Евидентно је да пиво са *Ganoderma lucidum* има акутни и одложени ефекат на цео кардиоваскуларни систем, који се могао пратити кроз промене крвног притиска и броја откуцаја срца. Резултати указују и на то да је дошло до смањења парасимпатичке контроле срца и измењене динамике QT интервала, што је могућа последица деловања биоактивних састојака (потеклих из *Ganoderma lucidum*) на калијумове канале. У шестом потпоглављу *Могућности пласирања добијених производа и трошкови производње* уређена је техноекономска анализа предложеног решења, при чему је утврђена цена производње једне флаше од 0,5l, уколико се пиво производи у великим пиварама, износи приближно 24,83 РСД за стандардно светло, односно 25,93 РСД за безалкохолно пиво. Уколико се, пак, производња врши у крафт пиварама, може се рачунати са ценом од око 44,60 РСД за стандардно, односно 47,90 РСД за безалкохолно пиво. У складу са тим, продајна цена би могла износити до 90 РСД. Осмишљен је и дизајн декларације безалкохолног пива на бази гљиве *Ganoderma lucidum* и представљен на слици.

У поглављу **Закључак** кандидат је у кратким тезама изнео најрелевантније закључке до којих се дошло. Са технолошког аспекта највећи принос добијен је код водених (6,06–6,36 g/100g), а најмањи код алкохолних екстраката (2,41–2,96 g/100g). Садржај α-глюкана и код

алкохолних и водених екстраката се кретао око 1,76 g/100g екстракта, док је садржај β -глюкана био у границама од 18,72 до 20,91 g/100g (алкохолних) екстракта, и 55,46 до 60,14 g/100g (водених) екстраката. Алкохолном екстракцијом са 70 % етанолом добијен је највећи садржај полифенолних материја (620,83 mg/l GAE) међу којима највише нарингенина (8,10 μ g/l), хесперетина (5,53 μ g/l), катехина (4,93 μ g/l) и ванилинске киселине (2,06 μ g/l). HPLC анализа безалкохолног пива и пива са *Ganoderma lucidum* показала је сличну количину фенолних једињења, изузев код *p*-хидроксibenзоеве, бензоеве, ванилинске киселине и сиригинске киселине, у којима је дошло до повећања за 0,10 mg/l, 0,12 mg/l, 0,27 mg/l, и 0,15 mg/l респективно. На бази LC-MS анализе констатовано је да су се, као најдоминантније компоненте код екстраката, издвојиле ганодеринске киселине А, Д и Г. GC-MS анализом идентификовано је 30 компоненти, а међу најдоминантнијим су етил-ацетат (15,662 mg/l), хексадеканска киселина (12,092 mg/l), изобутанол (10,291 mg/l) и етил олеат (9,885 mg/l), респективно. У погледу цитотоксичног ефекта највећи ефекат забележен је на HeLa ћелијама након 48 часова (123,8 $\pm$ 8,4 μ g/ml). Може се закључити да је безалкохолно пиво са екстрактом *Ganoderma lucidum* производ који има највише потенцијала на тржишту. Због својих сензорних својстава и функционалне вредности, захваљујући садржају биоактивних супстанци и пројектованој цени, могао би заузети посебну позицију како код потрошача опредељених за пиво без садржаја алкохола, тако и оних који теже производима са додатом вредношћу и супериорним сензорним својствима у односу на стандардне производе. Чињеница да овај производ не садржи алкохол (једини ограничавајући фактор када је стандардно пиво у питању), сврстава га у категорију функционалних напитака чиме се могућност његове примене проширује не само на освежавајућа и функционална својства, већ и на ефекат рехидратације организма. Имајући у виду чињеницу да његова производња не захтева посебне услове, са индустријског значаја представља посебну компаративну предност.

Литература. Кандидат је навео укупно 752 литерарне јединице, које представљају одабир најважнијих референци из области истраживања. Доминантан број референци чине радови објављени у међународним научним часописима, и то новијег датума.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дипл. инж. Саше Деспотовић, под насловом: „Биохемијска и функционална својства пива са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*“ представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са одобреном пријавом дисертације. Комисија сматра да је основни допринос ове докторске дисертације нови производ: специјално пиво са повећаним функционалним својствима на бази гљиве *Ganoderma lucidum*. У оквиру истраживања кандидат је извршио свеобухватну анализу релевантних фактора, потребних за сагледавање оправданости и применљивости оваквог решења. Са тог аспекта, тема и садржај дисертације су више него актуелни. Значајни су како са научног и стручног доприноса и могућности примене у условима индустрије пива, тако и аспекта шире примене екстраката *G. lucidum* у прехранбеној индустрији. Кандидат је обрадио изузетно велики материјал и обимну литературу и користио најсавременије научне и аналитичке методе. Систематски је проучио добијене резултате и правилно их упоредио са истраживањима других аутора. Закључци су добро изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Саше Деспотовић, дипл. инж. под насловом: „Биохемијска и функционална својства пива са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*“ и предлаже Научно-наставном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидату да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

У Београду,
31.03.2017.године

Чланови комисије:

Др Ида Лескошек-Чукаловић, редовни професор
Ужа научна област: Наука о врењу
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Виктор Недовић, редовни професор
Ужа научна област: Наука о врењу
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Миомир Никшић, редовни професор
Ужа научна област: Технолошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Љиљана Гојковић-Букарица, редовни професор
Ужа научна област: Клиничка фармакологија и токсикологија
Универзитет у Београду, Медицински факултет

Др Мирјана Пешић, ванредни професор
Ужа научна област: Биохемија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Јелена Пејин, ванредни професор
Ужа научна област: Биотехнологија
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет

Прилог:

Сепарат објављеног рада дипл. инж. Саше Деспотовић у научном часопису на SCI листи

Leskošek-Čukalović I., **Despotović S.**, Lakić N., Nikšić M., Nedović V., Tešević V., (2010): *Ganoderma lucidum* - medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties, Food Research International, 43 (9), 2262-2269.