

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број захтева: 32/9-8.5.

Датум: 29.06.2022.

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. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

Кандидат **НИКОЛИНА (Марко) ЛИСОВ**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: „Динамика садржаја биолошки активних фенолних једињења грожђа сорте Cabernet Sauvignon током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и утицај на антиоксидативни капацитет вина“

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 11.07.2017. године, својим актом 02-08 Број: 61206-2738/2-17 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **«Динамика садржаја биолошки активних фенолних једињења грожђа сорте Cabernet Sauvignon током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и утицај на антиоксидативни капацитет вина».**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 30.03.2022. године, одлуком Факултета број 32/6-6.5. у саставу:

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

1. др Александар Петровић, доцент, Наука о врењу, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Саша Матијашевић, ванредни професор, Посебно виноградарство, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Горица Вуковић, виши научни сарадник, Заштита биљака, фитофармација и токсикологија, Институт за заштиту биља и животну средину у Београду,
4. др Љиљана Гојковић-Букарица, редовни професор, Фармакологија са токсикологијом, Универзитет у Београду - Медицински факултет,
5. др Урош Чакар, научни сарадник, Броматологија, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 29.06.2022. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/9-8.5.
Датум: 29.06.2022. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 29.06.2022. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **НИКОЛИНА ЛИСОВ**, мастер и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«ДИНАМИКА САДРЖАЈА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ГРОЖЋА СОРТЕ Cabernet Sauvignon ТОКОМ ФЕНОФАЗА САЗРЕВАЊА, ПРИМАРНЕ ПРЕРАДЕ, ВИНИФИКАЦИЈЕ И УТИЦАЈ НА АНТИОКСИДАТИВНИ КАПАЦИТЕТ ВИНА».**

II Универзитет је дана 11.07.2017. године, актом 02-08 број: 61206-2738/2-17, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у научном часопису који га квалификује за одбрану докторске дисертације:

Lisov, N., Petrovic, A., Cakar, U., Jadranin, M., Tesevic, V., Gojkovic-Bukarica, Lj. (2020): Extraction kinetic of some phenolic compounds during Cabernet Sauvignon alcoholic fermentation and antioxidant properties of derived wines. Mac. J. of Chem. and Chem. Eng. 39(2): 185-196. DOI: 10.20450/mjcce.2020.2060.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум: 20.04.2022.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Николине М. Лисов, мастер инжењера технологије

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број: 32/6-6.5. од 30.03.2022. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: „Динамика садржаја биолошки активних фенолних једињења грозђа сорте Cabernet Sauvignon током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и утицај на антиоксидативни капацитет вина“, кандидата маст. инж. технол. Николине М. Лисов.

На основу прегледа, анализе и оцене докторске дисертације, Комисија подноси Наставно-научном већу Пољопривредног факултета следећи извештај

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација маст. инж. технол. Николине М. Лисов под насловом: „Динамика садржаја биолошки активних фенолних једињења грозђа сорте Cabernet Sauvignon током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и утицај на антиоксидативни капацитет вина“ написана је у складу са „Упутством о облику и садржају докторске дисертације која се брани на Универзитету у Београду“ на 187 страна, од којих је 175 нумерисано, и укључује 104 слике, 43 табеле и 227 литературних навода. Поред уобичајених уводних садржаја (насловна страна на српском и енглеском језику, страна са информацијама о члановима Комисије, страна са изјавама захвалности, стране са сажетком и кључним речима на српском и енглеском језику, приказ садржаја), докторска дисертација има 8 поглавља: **1- Увод** (стр. 1), **2- Преглед литературе** (стр. 2-33), **3- Циљ и значај истраживања** (стр. 33), **4- Материјал и методе** (стр. 34-51), **5- Резултати и дискусија** (стр. 51-146), **6- Закључак** (стр. 147-149), **7- Литература** (стр. 150-167), **8- Прилог** (стр. 168-170) као и Биографију аутора (стр. 171) и Изјаве о ауторству, о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и о коришћењу (стр. 172-175).

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У овом поглављу представљене су главне технолошке операције при производњи црвеног вина, са посебним освртом на грозђе као основну сировину која се користи. Истакнута је важност фенолних једињења као биоактивних компоненти грозђа и вина, али и комине која заостаје као нуз производ. Наглашено је од чега зависи садржај

фенолних једињења у грозђу, а касније и у вино. Представљене су основе за проналажење најоптималнијег технолошког поступка за њихову екстракцију првенствено из грозђа у вино, а касније експлоатацијом комине као њиховог богатог извора. Са садржајем и синергијом фенолних једињења повезана је њихова антиоксидативна активност и велики здравствени значај који је предочен у овом поглављу.

Преглед литературе. У оквиру прва два потпоглавља, наглашене су актуелне информације у вези поделе фенолних једињења, са детаљним приказом њихових структура и садржајем у грозђу и вино. Осим представљања флавоноида истакнуте су и нефлавоноидне компоненте (деривати бензоеве и деривати хидроксициметне киселине) које такође имају антиоксидативна својства и у стању су да предупредe штетно деловање слободних радикала. Дат је детаљан табеларни приказ ензимских и неензимских антиоксиданаса међу којима су истакнута фенолна једињења вина. Такође приказан је и литературни преглед биоактивног деловања појединих фенолних једињења из вина. Треће и четврто потпоглавље везано је за фенофазе сазревања грозђа као и утицај сиве плесни (*Botrytis cinerea*) на фенолни профил вина. Како се наводи у литератури, степен зрелости грозђа има битну улогу у фенолном садржају бобице, а после и вина. При производњи црвеног вина посебан корак јесте цеђење превреле комине па је у петом поглављу акценат стављен на примену различитог притиска цеђења. Подаци из литературе говоре о позитивној корелацији примењеног притиска цеђења превреле комине и садржаја фенолних једињења у вино. Посебна пажња дата је обрађивању главне тематике (у шестом, седмом, осмом и деветом потпоглављу), а то је утицај алкохолне ферментације и мацерације кљука на садржај фенолних једињења у будућем вино и заосталој комини. Сматра се да је мацерација кључна за екстракцију фенолних једињења и наведен је велики број литературних навода који то потврђују. За екстракцију ових једињења из комине не постоји јединствена екстракциона метода. Ти процеси објашњени су другим Фиковим законом дифузије где је брзина дифузије функција градијента растворене супстанце и унутрашњег коефицијента дифузије. Примењени су различити вински селекционисани квасци (као и нутритијенти) и ензимски препарати који различито утичу на фенолни састав вина. Такође дат је посебан осврт на појединачна фенолна једињења и њихово оптимално време мацерације за максималну количину екстракције код вина од различитих црних сорти грозђа. На основу доступне литературе сматра се да је комина грозђа посебно богата фенолним киселинама које чине 83% од укупних фенолних једињења комине. Истакнуто је да је сваки начин екстракције фенолних једињења из појединих делова грозђа и комине различит, па самим тим добијени резултати могу варирати у већој или мањој мери. Десето потпоглавље посвећено је антиоксидативном капацитету вина и екстракта комине, који је у директној вези са садржајем фенолних једињења. Како алкохолна ферментација одмиче, ствара се све већа количина алкохола па долази и до веће екстракције поменутих биолошки активних компоненти чиме ће се и њихово антиоксидативно својство повећати. У наредних шест потпоглавља дат је детаљан преглед литературе која наводи и остале чиниоце који имају утицај на динамику екстракције фенолних једињења у вино. То су различити видови винификације (термичка и карбонска мацерација), као и третмани стабилизације и време одлежавања вина. Од третмана стабилизације посебно је обрађен утицај сумпордиоксида, аскорбинске киселине, малолактичке ферментације и пастеризације на фенолни састав вина. Истакнуто је антиоксидативно својство сумпордиоксида које има улогу спречавања оксидације ових

значајних једињења. Испитано је и дејство више различитих средстава за бистрење (калијум-казеинат, албумин, рибљи мехур и желатин) на поједина фенолна једињења у вину. Наведено је да време одлежавања вина различито утиче на фенолна једињења и да се непрестано одигравају реакције кондензације, оксидације, полимеризације и стављен је акценат на промену фенолног састава вина.

Циљ и значај истраживања. Основни циљ истраживања је био да се на основу праћења динамике уз укључивање и других параметара у технолошки процес производње, добију вина са што већим садржајем биолошки активних компонената значајних за здравље људи. У оквиру тога постављено је неколико специфичних циљева као што су утицај оптималног степена зрелости грозђа, утицај неких комерцијалних ензимских препарата који се примењују ради боље екстракције фенолних једињења из чврстих делова грозђа као и сојеви квасаца различите гликозидолитичке активности, а све то у оквиру примарне прераде. С тим у вези, задатак је био анализирати њихов утицај на динамику садржаја фенолних једињења током винификације. Примењена је и термичка и карбонска мацерација с циљем испитивања таквих видова мацерације на промене фенолног састава вина. Потребно је било утврдити и утицај растућег притиска цеђења превреле комине на повећање количине појединачних фенолних једињења као и њиховог садржаја који је заостао у комини и комини цеђеној применом различитих притисака. Новодобијена вина отворила су пут будућим истраживањима која имају за циљ испитивање утицаја средстава за бистрење и стабилизацију вина која се уобичајено користе на количину појединих фенолних једињења, а на крају и утицај времена одлежавања истог у судовима различитог материјала и запремине.

Материјал и методе. Ово поглавље подељено је на двадесетчетири потпоглавља са више поднаслова. У првом и другом потпоглављу детаљно је описан локалитет винограда као и агробилошке карактеристике грозђа сорте Cabernet sauvignon, као и технолошке и сензорске карактеристике шире и вина анализираних сорте. У потпоглављу *Микровинификација* дат је детаљан приказ технолошког процеса прераде грозђа и постављање експеримената праћења динамике екстракције фенолних једињења током 21 дан мацерације. Експерименти су постављени на Огледном добру Пољопривредног факултета „Радмиловац“ у Београду, одакле потиче и грозђе. Винификација по поступку за црвена вина подразумевала је муљање грозђа уз одвајање шепурине, сулфитисање кљука са 10g винобрана на 100kg, а затим засејавање одређеним винским селекционисаним квасцима и третирање кљука ензимским препаратима. Берба 2016. године подразумевала је инокулацију винског квасца BDX (Lallemand, Канада) у комбинацији са три различита ензимска препарата (EXV, Lallemand, Канада; CP, Enartis, Италија; Car, Enartis, Италија), а време мацерације за сваки оглед трајало је 3, 5, 7, 14 и 21 дан, тако да је на крају добијено 15 вина плус контролни узорак који је добијен винификацијом по поступку за бела вина (без мацерације). Године 2018. прерада је била идентична с тим што је микровинификација постављена као спонтана и инокулисана са винским селекционисаним квасцима BDX, FX10 (Laffort, Француска) и Qa23 (Lallemand, Канада), а време мацерације је било исто. Исте године друга варијанта огледа обухватала је засејавање квасцем BDX уз додатак ензимских препарата EXV и CB (Lallemand, Канада), а мацерација је трајала исто 3, 5, 7, 14 и 21 дан. После винификације добијено је 30 вина као и комплементарни узорци комине који су одвајани после одређеног периода

мацерације и замрзавани до анализа. Поред тога свака варијанта огледа имала је и контролни узорак (поступак за бела вина) као и комплементарну контролну комину. У четвртом потпоглављу детаљно су приказани сви коришћени квасци и ензимски препарати. Сви коришћени квасци су били *Saccharomyces cerevisiae* врсте, а то су BDX, FX10 и Qa23. Ензимски препарат коришћен у обе године истраживања је био пектинолитички ензим EXV. Поред тога коришћени су СВ (пектиназа са глукозидазном активношћу), СР (пектинолитички препарат богат пектиназама и целулазом, хемицелулазне и протеазне споредне активности) и Саg (пектинолитичка и хемицелулазна активност са β - гликозидазном бочном активности). У петом потпоглављу *Испитивање утицаја различитог степена зрелости грозђа на фенолни састав вина и комине* описан је оглед винификације грозђа у три фенофазе зрелости. Грожђе је убрано у фази шарка, пуне зрелости и презрелости и прерађено по поступку за црвена вина уз сулфитисање и засејавање квасцем BDX. Мацерација је трајала 21 дан уз потапање два пута дневно. Шесто потпоглавље *Испитивање утицаја захваћености грозђа сивом плесни Botrytis cinerea на фенолни састав вина* описује микровинификацију здравог и плеснивог грозђа. Грожђе за овај експеримент потиче из винограда винарије Тришић у Вранићу надомак Београда. Прерађено је по већ описаном поступку за црвена вина. Ферментација је обављена на $25 \pm 2^\circ\text{C}$, а након мацерације од 14 дана комина одвојена, а вина разливена у балоне до флаширања. Експеримент везан за утицај различитих притисака цеђења на фенолни састав вина описан је у седмом потпоглављу. Овај оглед постављен је у винарији Саге Diem у Лазаревцу и комина је након 14 дана мацерације цеђена под притиском од 0,5, 1 и 1,5 бар. Добијене фракције вина су флаширане, а заостала комина замрзнута до анализа. Осмо поглавље даје преглед анализа које су вршене на винима различитог времена мацерације добијених праћењем динамике екстракције применом поменутих квасаца и ензимских препарата. Анализирана је динамика екстракције појединих фенолних једињења, укупних фенолних једињења као и одређивање антирадикалског и антиоксидативног капацитета током различитих периода мацерације. У деветом поглављу *Испитивање утицаја хранива за квасце на фенолни састав вина* детаљно је описан поступак производње вина по претходно описаној шеми уз квасац BDX и додатак амонијачног и аминокиселинског хранива. Потпоглавље *Примена термичке мацерације* односио се на приказ прераде грозђа и производње вина уз термичку мацерацију на 60 и 80°C . Измуљано грозђе је загревано 60 минута на нижој температури и 30 минута на 80°C . После хлађења кљук је инокулисан квасцем BDX, а класична мацерација је трајала 14 дана. Следеће потпоглавље *Примена карбонске мацерације* описује мацерацију целих бобица грозђа у засићеној атмосфери угљен-диоксида. Коришћени квасац је био BDX и мацерација је трајала 7 дана. Потпоглавље *Испитивање утицаја различитих средстава за бистрење на фенолни састав вина* приказује поставку експеримента који је везан за коришћење желатина, калијум-казеината, албумина и риблиг мехура у различитим концентрацијама. Огледи су вршени на 200 ml вина сорте Cabernet sauvignon, које је такође производ ових истраживања. На новодобијеним винима извршени су огледи стабилизације вина што је детаљно представљено у потпоглављу *Испитивање утицаја стабилизације вина на фенолни састав (аскорбинска киселина, SO_2 , малолактичка ферментација, пастеризација)*. Године 2016. и 2018. постављени су огледи прераде грозђа и производње вина уз исти квасац BDX и исти ензимски препарат EXV. Мацерација је трајала исти временски период, а то је 3, 5, 7, 14 и 21 дан, након чега је одвојено младо вино у балоне до флаширања. Овај експеримент описан је у потпоглављу

Поређење садржаја појединих фенолних једињења различитих берби 2016. и 2018. године. Експерименти везани за *Испитивање утицаја старости засада винограда на фенолни састав вина* описани су у петнаестом потпоглављу. *Испитивање утицаја одлежавања вина у различитим судовима на фенолни састав* наслов је последњег потпоглавља везаног за експериментални део и детаљно је објашњен. Дат је детаљан поступак припреме узорака вина и комине за анализу LC-MS/MS техником. Приказана је припрема узорака екстракцијом на чврстој фази (*solid phase* екстракција) која је обухватала неколико корака (кондиционирање, еквилибрацију, наношење узорка, испирање и елуирање анализата). Поступак припреме комине садржао је неколико корака. Вршено је одмеравање узорака, лиофилизација, екстракција на воденом купатилу (метанол/вода), реекстракција и упаравање добијених филтрата који су растварани у 12% етанолу да би се добили узорци налик вину. Квантификацији појединих фенолних једињења из покожице и семенке грожђа претходила је такође припрема која је обухватала лиофилизацију покожице, екстракцију у смеси метанол/вода на воденом купатилу, а затим филтрирање узорака (филтери 0,45 μm). Даље је дат детаљан опис метода које су се користиле за квантификацију појединих фенолних једињења (LC-MS/MS), метода за одређивање садржаја укупних фенолних једињења (Folin-Ciocalteu), методе за одређивање антирадикалске и антиоксидативне активности (anti-DPPH radical activity, FRAP и TEAC) и количине слободног сумпордиоксида. Последња два потпоглавља садрже коришћене стандарде и хемијске реагенсе као и статистичке програме, тестове и методе анализе.

Резултати и дискусија. Ово поглавље представља најопширнији део дисертације и садржи деветнаест потпоглавља (са више поднаслова) у којима су приказани резултати динамике садржаја фенолних једињења током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и на крају антиоксидативни капацитет новодобијених вина као и узорака превреле комине. Приказ резултата дат је на прегледан начин кроз табеле, графичке приказе (слике) и дискусију која је јасна и темељна, уз поређење са резултатима сличних истраживања. У потпоглављу *Утицај степена зрелости грожђа на фенолни састав вина и комине* представљен је фенолни састав појединих делова грозда (покожице и семенке), вина као и превреле комине која заостаје након производње. У екстрактима свежих семенки детектована су три једињења, гална киселина, катехин и епикатехин, међу којима је најдоминантнији био катехин. Највиша концентрација ових једињења детектована је у семенкама фазе шарка, а са повећањем степена зрелости њихов садржај у семенкама је опадао. Максимална концентрација катехина у покожици била је $4,35 \pm 0,04 \text{ mg/kg}$ свежје покожице. Што се тиче садржаја катехина и епикатехина у узорцима комине различитих фаза зрелости, најниже вредности за оба једињења нађене су у комини од презрелог грожђа, а највиши садржај је измерен у екстрактима комине пуне зрелости. Највиши садржај катехина и епикатехина нађен је у вину фазе пуне зрелости ($40,13 \pm 3,25 \text{ mg/l}$ односно $22,29 \pm 1,50 \text{ mg/l}$). Од деривата бензоеве киселине у свежој покожици су детектоване сиригинска и гална киселина, док је у узорцима комине најдоминантнија била сиригинска киселина. Деривати хидроксициметне киселине нису детектовани у екстрактима покожице, а у заосталој комини и вину различитих фаза зрелости идентификоване и квантификоване су кафеинска, *p*-кумаринска и ферулинска киселина. Концентрације нарингенина и *транс*-ресвератрола у покожици су биле врло ниске, док је најдоминантнији био кверцетин као и у узорцима комине пуне зрелости где је нађен у количини од $10,96 \pm 0,14 \text{ mg/kg}$. У потпоглављу *Утицај захваћености грожђа сивом плесни*

Botrytis cinerea на фенолни састав вина приказани су резултати 17 фенолних једињења квантификованих у вину од здравог и плеснивог грожђа. Забележен је пад концентрације епикатехина и катехина у винима од ботритизираног грожђа у односу на вина од здравог грожђа за 28,51% код катехина и 10,90% код епикатехина. Садржај кверцетина у ботритизираним винима је великој мери умањен, док кемферол, нарингенин и рутин нису детектовани у истим. Потпоглавље *Утицај примене различитог притиска цеђења превреле комине на фенолни састав вина и заостале комине* садржи темељно продискутоване резултате 17 квантификованих фенолних једињења у прешевинама добијених цеђењем кљука растућим притисцима. Концентрација свих 17 фенолних једињења се повећала за 6,45% уз пресовање комине притиском 0,5 бара у односу на концентрације фенолних једињења добијене анализирањем самотока. Притисак од 1 бар је повећао концентрацију ових једињења за 15,53% у односу на самоток, док је 1,5 бар допринео још већој екстракцији анализираних фенолних једињења у вину и то за 28,82% у односу на самоток. У потпоглављу *Утицај додатка хранива за квасце на фенолни састав вина* приказане су и продискутоване количине 13 фенолних једињења квантификованих у винима добијеним ферментацијом квасцем BDX уз додаток амонијачног и аминокиселинског хранива. Нађена је значајна разлика у садржају деривата бензоеве киселине у вину коме је додавано амонијачно храниво у односу на контролно вино. У потпоглављу *Кинетика екстракције укупних фенолних једињења у вину и комини током алкохолне ферментације и мацерације* кљука истакнут је експоненцијални пораст садржаја укупних фенолних једињења током 21 дана мацерације, с тим што је варијанта огледа спонтане ферментације имала најкаснији и највиши максимум екстракције у количини од 1963,40 mg/l, када се пореде вина инокулисане и спонтане ферментације. Повећање садржаја укупних фенолних једињења са продужетком мацерације констатовано је и за узорке вина добијене засејавањем квасцем BDX уз примену ензимских препарата. Највећа брзина екстракције укупних фенолних једињења остварена је 16. дана мацерације код огледа BDX + EXV у 2018. години и износила је 9,00 mg/dan, а екстраховано је 1597,75 mg/l укупних фенолних једињења изражених као гална киселина. Поређењем садржаја укупних фенолних једињења у вину добијених уз примену квасца и квасца са ензимским препаратима није установљена значајна разлика. У огледу 2016. године најбоље се показала комбинација квасца BDX и ензимског препарата EXV у смислу највише екстракције укупних фенолних једињења. У варијанти огледа спонтане ферментације највећи садржај укупних фенолних једињења заосталих у преврелој комини нађен је после три дана мацерације у количини од $3719,75 \pm 96,0$ mg/kg превреле комине. У варијантама огледа спонтане ферментације, BDX + CB, BDX + EXV₂₀₁₆, као и инокулације са винским селекционисаним квасцем Qa23, забележен је експоненцијални пад садржаја укупних фенолних једињења са минимумом 21. дана мацерације. У случају варијанти огледа инокулације са селекционисаним винским квасцем FX10 минимална количина укупних фенолних једињења је нађена после 12 дана мацерације, а у случају квасца BDX, након 13 дана мацерације. После тога, дошло је до повећања садржаја укупних фенолних једињења у комини све до 21. дана мацерације. Примена ензимских препарата није значајно утицала на садржај укупних фенолних једињења у комини, али је време мацерације било значајно. У потпоглављу *Кинетика екстракције појединих фенолних једињења у вину током алкохолне ферментације и мацерације* кљука уз примену различитих квасаца и ензимских препарата приказана је динамика садржаја галне киселине, протокатехуинске киселине, *p*-хидроксисензоеве киселине, сиригинске киселине, ванилинске киселине, кафеинске

киселине, елагинске киселине, *p*-кумаринске киселине, катехина, епикатехина и кверцетина током 21 дан мацерације. Од свих варијанти огледа квасаца и ензима, за обе године истраживања, највиши садржај галне киселине добијен је применом квасца BDX у комбинацији са ензимским препаратом СВ уз мацерацију од 21 дан (4,6600 mg/l). Протокатехуинска киселина достигла је максимум већ 10. дан мацерације (2,5984 mg/l) код FX10 варијанте огледа, док је код осталих огледа спонтане и инокулисане ферментације максимум био 11. дан мацерације. Од свих анализираних једињења, *p*-хидроксибензоева киселина, је најраније достигла свој максимум, већ 3. дана мацерације у количини 1,0485 mg/l уз селекционисани вински квасац BDX. Утврђена је значајна разлика у садржају овог једињења у винима спонтане и винима инокулисане ферментације квасцем Qa23. У огледима са ензимима, комбинација BDX + СВ је дала највишу екстраховану количину сиригинске киселине и то 9,4652 mg/l, 12. дан мацерације при максималној брзини од 0,0665 mg/dan. Садржај кафеинске киселине није се значајно мењао у винима спонтане и инокулисане ферментације. Пратећи кинетику екстракције кафеинска и ванилинска киселина своје максимуме екстракције су достигле 12. дан мацерације и то за варијанте огледа спонтане ферментације и уз квасац Qa23. Засејавање кљука различитим квасцима, као и комбинација квасца и ензима, није довела до значајне разлике у садржају елагинске киселине у односу на спонтану ферментацију. За издвајање највише количине *p*-кумаринске киселине, најбоље се показала примена квасца FX10. У том огледу максимална екстрахована количина је износила 9,9765 mg/l и остварена је 12. дан мацерације. Максимум екстракције катехина и епикатехина, за све варијанте огледа са квасцима и са ензимима за 2018. годину, остварен је 21. дана мацерације са највишим издвојеним количинама за ферментацију уз додатак винског селекционисаног квасца BDX. Максимална издвојена количина за епикатехин у 21. дану мацерације износила је 18,7350 mg/l, док је за катехин та количина била 36,3108 mg/l. Кверцетин се екстраховао до 21. дана мацерације уз селекционисани вински квасац BDX, и тада је достигао максималну издвојену количину од 0,7637 mg/l, док је при спонтаној ферментацији максимум достигао већ 11. дана мацерације у количини од 1,4840 mg/l, што је најраније од свих варијанти огледа са и без квасаца. У потпоглављу *Поређење максималних екстрахованих количина фенолних једињења спонтано и инокулисано ферментисаних узорака* изнете су тврдње да није установљена значајна разлика између максималних екстрахованих количина фенолних једињења у вину спонтане и инокулисане ферментације. У потпоглављу *Поређење брзина екстракције фенолних једињења спонтано и инокулисано ферментисаних узорака* истакнуто је да се брзине екстракције фенолних једињења у инокулисаним и спонтано ферментишућим узорцима нису значајно разликовале. У следећем потпоглављу *Анализа главних компонената* изнети су резултати статистичке анализе на основу садржаја 12 фенолних једињења у винима свих периода мацерације уз примену спонтане ферментације, инокулисане ферментације (BDX, FX10 и Qa23) и комбинованих огледа BDX + СВ и BDX + EXV. Резултати добијени за појединачна испитивана једињења у винима добијеним комбинацијом квасца BDX и ензимских препарата EXV, Саг и СР су обрађени методом редукције фактора. И у овом случају оправданост анализе је потврђена Кајзер Мајер Олкиновим критеријумом који је био 0,695, и Бартлетовим тестом сферичности који је показао статистичку значајност. У наредном потпоглављу *Утицај примене термичке мацерације на фенолни састав вина* истакнуто је да је у винима добијеним термичком мацерацијом дошло до знатног пораста садржаја укупних фенолних једињења и то више уколико је температура била виша.

Највећи садржај је забележен код узорка Т80 (80°C) и кретао се до $3130 \pm 55,00$ mg/l, док је садржај у узорку Т60 (60°C) био $2800 \pm 40,00$ mg/l. Све анализиране фенолне киселине имају виши садржај у вину добијеном класичном мацерацијом (контроли), осим кафеинске киселине чији је садржај био највиши у вину добијеном термичком мацерацијом на 60°C ($7,58 \pm 0,20$ mg/l). У винима добијеним термичком мацерацијом, гална, сиригинска и ванилинска киселина су биле најприсутније, док је највиши садржај био у контроли добијеној класичном мацерацијом. Концентрација сиригинске киселине је у вину добијеном термичком мацерацијом на 80°C смањена до 57%, док је у вину добијеном термичком мацерацијом на 60°C смањена за 52% у односу на контролу. У потпоглављу *Утицај примене карбонске мацерације на фенолни састав вина* приказани су резултати фенолних једињења детектованих у винима карбонске и класичне мацерације. Занимљиво је истаћи да су деривати хидроксициметне киселине у винима карбонске мацерације екстраховани у вишим количинама него у узорцима добијеним класичном мацерацијом која је трајала 7 дана, где ферулинска и кафеинска киселина нису детектоване, док су деривати бензоеве киселине били виши у контролним винима. У потпоглављу *Утицај примене различитих средстава за бистрење на фенолни састав вина* представљени су резултати количина 13 фенолних једињења у винима после третирања албумином, желатином, рибљим мехуром и калијум-казеинатом и констатовано смањење њиховог садржаја за све примењене дозе. Концентрација галне киселине је смањена највише додатком рибљег мехура (20 g/hl) и то 34,80%. На *p*-хидроксибензоеву киселину највећи утицај имао је додатак калијум казеината у концентрацији 15 g/hl чиме је смањен њен садржај до 48,03%, док је садржај протокатехуинске под утицајем истог средства смањен за 34,97%. Садржај ванилинске и сиригинске киселине је највише смањен додатком калијум казеината (15 g/hl) и то 32,14% и 37,03%. Највеће смањење кафеинске киселине изазвао је додатак калијум казеината (10 g/hl) до 40,82%, док је *p*-кумаринска киселина достигла највеће смањење (39,36%) додатком истог средства у већој дози од 15 g/hl. У потпоглављу *Утицај стабилизације вина на фенолни састав (аскорбинска киселина, SO₂, малолактичка ферментација, пастеризација)* констатовано је да додатак аскорбинске киселине, примењене малолактичке ферментације и пастеризације није значајно утицао на промену концентрације деривата бензоеве киселине, деривата хидроксициметне киселине, *транс*-ресвератрола, кверцетина, нарингенина, катехина и епикатехина. Што се тиче утицаја сумпордиоксида истакнуто је да количине слободног SO₂ од 43 и 55 mg/l значајно делују на промену садржаја анализираних фенолних једињења. У потпоглављу *Поређење садржаја појединих фенолних једињења различитих берби 2016. и 2018. године* обрађени су резултати 12 фенолних једињења у винима обе бербе и истакнуто да постоји значајна разлика у садржају галне, елагинске, *p*-кумаринске, *p*-хидроксибензоеве, протокатехуинске, сиригинске и ванилинске киселине. У потпоглављу *Утицај двогодишњег одлежавања вина у различитим судовима на фенолни састав* констатовано је да постоји разлика у садржају катехина и епикатехина у вину из инокса и вину које је одлежавало у стакленим бутелкама. У потпоглављу *Утицај старости засада винограда на фенолни састав вина* дат је садржај појединих фенолних једињења вина која су добијена од грожђа из три различита винограда (млад засад, средње стар засад и засад винограда после вишедеценијске експлоатације). У потпоглављу *Утицај различитих винских селекционисаних квасаца и ензимских препарата на кинетику екстракције појединих фенолних једињења комине током мацерације* дати су детаљни прикази промене садржаја рутина, *транс*-ресвератрола, катехина, епикатехина, *p*-

кумаринске киселине и ванилина који заостају у комини после различитих периода мацерације од 3, 5, 7, 14 и 21 дан. За садржај рутина у узорцима комине која је мацерирала 3, 5, 7, 14 и 21 дана уз потапање два пута дневно, запажен је тренд експоненцијалног опадања од периода најкраће мацерације тј. трећег дана до 21. дана мацерације за све варијанте огледа. Комина која је мацерирала у периодима од 14 и 21 дан садржала је статистички вишу количину *транс*-ресвератрола у односу на комину која је одвојена након 3, 5 и 7 дана мацерације. Код свих приказаних варијанти огледа садржај катехина и епикатехина је десорбован од почетка мацерације па до 14. дана након чега је дошло до успостављања равнотеже или је настављена блага десорпција. Слично понашање констатовано је и за ванилин и *p*-кумаринску киселину где су нађене више концентрације у узорцима комине која је краће мацерирала. Највише вредности сиригинске киселине екстраховане су из комине која је мацерирала у кљуку засејаним селекционисаним винским квасцем Qa23 и кретале су се од 4,83 до 10,24 mg/kg превреле комине. Што се тиче садржаја флавонола садржај кверцетина је био најдоминантнији и његова концентрација у узорцима комине добијене уз примену спонтане и инокулисане ферментације и различитих ензимских препарата кретала се од 1,70 до 12,17 mg/kg превреле комине. У потпоглављу *Антиоксидативни капацитет узорака вина* истакнуто је да вина чија је мацерација дуже трајала имају већу антирадикалску активност (anti-DPPH radical activity) за све огледе са квасцима и комбинацијом квасаца и ензима. За антиоксидативни капацитет измерен тестом TEAC за вина из 2016. године најбоље се показао оглед BDX + EXV, где је највиши антиоксидативни капацитет измерен у узорку који је мацерирао 21 дан и то 16,80 mmol TE/l. За вина из 2018. године иста комбинација квасаца и ензима дала је најбоље резултате (16,15 mmol TE/l), а нешто нижи антиоксидативни капацитет измерен је у винима огледа самог квасца BDX и то 16,06 mmol TE/l. Нађене су највише вредности FRAP управо у винима са најдужом мацерацијом (21 дан), а значајна разлика нађена је између контрола и вина дужих мацерација за огледе 2018. године са квасцима и комбинацијом квасаца и ензима. И последње потпоглавље ове дисертације под насловом *Антиоксидативни капацитет узорака превреле комине* представља антиоксидативни капацитет измерен тестом TEAC и методом FRAP. Од анализираних узорака превреле комине огледа спонтане и инокулисане ферментације (BDX, FX10, BDX + CB), највиши антиоксидативни капацитет имао је узорак комине спонтане ферментације и мацерације од 5 дана који је износио 49,46 mmol Fe²⁺/kg за методу FRAP као и 25,80 mmol TE/kg за тест TEAC. Установљена је позитивна корелација антиоксидативног капацитета комине и садржаја укупних фенолних једињења у истој.

Закључак. У овом поглављу су резимирани резултати експерименталних истраживања и изведени одговарајући закључци.

- У винима од грожђа сорте Cabernet sauvignon у различитим фазама зрелости није установљена статистички значајна разлика у садржају деривата бензоеве киселине, катехина и епикатехина. Закључено је да је вино фазе шарка дало највишу концентрацију *транс*-ресвератрола. Није нађена значајна разлика у садржају кверцетина, нарингенина и *транс*-ресвератрола детектованих у pokožици грожђа.
- У винима од ботритизираниог грожђа забележено је смањење концентрације епикатехина за 10,90% и катехина за 28,51% у односу на вино од здравог грожђа.
- Примена различитих притисака цеђења превреле комине имала је значајан утицај на фенолни састав вина у односу на вино произведено од самотока. Утицај пресовања

превреле комине притиском 1,5 бар је имао значајан утицај на екстракцију деривата бензоеве киселине (сирингинске, галне, *p*-хидроксибензоеве, протокатехуинске, ванилинске и елагинске киселине) у односу на количине у самотоку. Анализом заосталих фенолних једињења у комини само за деривате бензоеве киселине нађена је значајна разлика између самотока и прешевина (0,5 бара, 1 бар и 1,5 бара).

- Мацерација у трајању од 21 дан, била је кључна за највиши садржај фенолних једињења у вину спонтане ферментације, док су огледи инокулисане дали раније максимуме али са нижим садржајем укупних фенолних једињења. Примена ензимских препарата EXV и CB није остварила значајну промену у садржају укупних фенолних једињења у односу на вина која су ферментисала уз квасац без ензимских препарата.
- Дужина мацерације се показала значајном када је у питању садржај укупних фенолних једињења и спонтане и инокулисане ферментације. Трајање мацерације значајно је утицало на садржај укупних фенолних једињења која су заостала у комини после ферментације квасцем BDХ и квасцем BDХ уз додатак ензимских препарата EXV₂₀₁₆, CP и Caг.
- Садржај галне киселине у винима различитог времена мацерације, спонтане и инокулисане ферментације је значајно промењен у поређењу са контролом. Допатак ензимских препарата CP и Caг имао је исти утицај на садржај галне киселине, за разлику од осталих примењених ензимских препарата.
- Контролно вино и вина различитог времена мацерације са и без квасца као и уз додатак ензимских препарата EXV и CB (2018. година) као и Caг и CP (2016. година), значајно су се разликовала у садржају протокатехуинске киселине.
- Допатак ензимског препарата EXV током мацерације и ферментације квасцем BDХ значајно је променио садржај *p*-хидроксибензоеве киселине у винима у поређењу са винима истих периода мацерације и ферментације истим квасцем али без додатог ензимског препарата.
- Садржај катехина и епикатехина није се значајно разликовао у вину спонтане и инокулисане ферментације, као ни у огледима са применом квасца и ензимских препарата.
- Вина добијена термичком мацерацијом на 60 и 80°C и контролна вина класичне мацерације нису се значајно разликовала у садржају катехина, епикатехина, *транс*-ресвератрола, кверцетина и кемферола. Једино је примењена мацерација на 80°C значајно утицала на садржај деривата хидроксициметне и бензоеве киселине у поређењу са класичном мацерацијом. Карбонска мацерација није остварила значајан утицај на садржај испитиваних фенолних киселина, а садржај укупних фенолних једињења је био виши применом класичне мацерације.
- Закључено је да су сва примењена средства за бистрење вина смањила концентрацију појединих фенолних једињења у вину, у свим примењеним дозама.
- Од третмана за стабилизацију вина значајан утицај показали су узорци који су имали већи садржај слободног сумпордиоксида у односу на контролу.
- Поређењем 12 истих фенолних једињења квантификованих у вину произведеном по истој технологији производње 2016. и 2018. године, закључено је да постоји статистички значајна разлика у садржају галне, елагинске, *p*-кумаринске, *p*-хидроксибензоеве, протокатехуинске, сирингинске и ванилинске киселине.
- Током двогодишњег одлежавања вина у инокс суду и у стакленој боци, нађена је значајна разлика у садржају катехина и епикатехина.

- Катехин и епикатехин су била најдоминантнија једињења нађена у комини грожђа и то оној која је мацерирала краћи временски период па је закључено да је време мацерације значајно утицало на садржај појединих једињења у преврелој комини. На садржај ванилина у преврелој комини само је примена квасца Qa23 дала значајну разлику у односу на спонтану ферментацију. Комина која је мацерирала 14 и 21 дан садржала је статистички вишу количину *транс*-ресвератрола у односу на комину која је одвојена након 3, 5 и 7 дана мацерације.
- Закључено је да је време мацерације од 21 дан остварило највећи антиоксидативни капацитет у винама, док је антиоксидативни капацитет превреле комине био већи у узорцима који су мацерирали краћи временски период. Узорак превреле комине чија је мацерација трајала 5 дана уз спонтану ферментацију остварио је највећи антиоксидативни капацитет одређен методом FRAP и тестом TEAC.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 227 литературних навода, који представљају извор и преглед најзначајнијих радова из области истраживања ове докторске дисертације. Избор референци је актуелан, а цитирање је изведено на правилан начин.

Прилог. Приказани су хроматограми појединих фенолних једињења добијени LC MS/MS техником.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу анализе докторске дисертације под насловом „Динамика садржаја биолошки активних фенолних једињења грожђа сорте Cabernet Sauvignon током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и утицај на антиоксидативни капацитет вина“, коју је поднела Николина М. Лисов, маг. инж. технол., Комисија сматра да је дисертација урађена према одобреној пријави теме и да представља оригинално и самостално научно дело.

Кандидаткиња је детаљно и систематски истражила доступне литературне податке, на основу којих је дефинисала и поставила јасне циљеве и програм истраживања. Примењујући адекватне, савремене методе и технике кандидаткиња је веома успешно обавила експериментални део истраживања, што је и документовала резултатима дисертације. Добијени резултати су прегледно приказани, правилно анализирани и коментарисани и упоређивани с доступним подацима из литературе. Закључци су добро изведени и у сагласности са добијеним резултатима и вођеном дискусијом.

Резултати овог истраживања су значајни како за науку, тако и за практичну (технолошку) примену.

Динамика екстракције биолошки активних компоненти као што су фенолна једињења је темељно представљена и обрађена за свако појединачно једињење што је битно са аспекта добијања вина са што већим садржајем ових компоненти. Утврђено је оптимално време мацерације као и примена технике винификације уз укључивање одређених квасаца и ензимских препарата. Детаљно су описани феномени екстракције фенолних једињења из комине у вино током контакта чврсте и течне фазе и приказан садржај појединих фенолних једињења која заостају у комини након алкохолне ферментације и мацерације. Добијени резултати отварају могућност ка производњи вина са високим садржајем

биолошки активних фенолних једињења, као и потенцијалном искоришћењу комине у фармаколошке или прехранбене сврхе.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију маг. инж. технол. Николине М. Лисов, под насловом „Динамика садржаја биолошки активних фенолних једињења грозђа сорте Cabernet Sauvignon током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и утицај на антиоксидативни капацитет вина”, и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену и омогући кандидаткињи јавну одбрану.

Чланови Комисије:

др Александар Петровић, доцент
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
Ужа научна област: Наука о врењу

др Саша Матијашевић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
Ужа научна област: Посебно виноградарство

др Горица Вуковић, виши научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд
Ужа научна област: Заштита биљака, фитофармација и токсикологија

др Љиљана Гојковић-Букарица, редовни професор
Универзитет у Београду, Медицински факултет
Ужа научна област: Фармакологија са токсикологијом

др Урош Чакар, научни сарадник
Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет
Ужа научна област: Броматологија

Прилог:

Рад Николине М. Лисов, магист. инж. технол., објављен у међународном научном часопису који је на SCI листи:

Lisov, N., Petrovic, A., Cakar, U., Jadranin, M., Tesevic, V., Gojkovic-Bukarica, Lj. (2020): Extraction kinetic of some phenolic compounds during Cabernet Sauvignon alcoholic fermentation and antioxidant properties of derived wines. Mac. J. of Chem. and Chem. Eng. 39(2): 185-196. DOI: 10.20450/mjcce.2020.2060.

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

Датум: 20.04.2022.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Динамика садржаја биолошки активних фенолних једињења грозђа сорте Cabernet Sauvignon током фенофаза сазревања, примарне прераде, винификације и утицај на антиоксидативни капацитет вина“, аутора Николине М. Лисов, маг. инж. технол., констатујем да утврђено подударање текста износи 10%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ментор:

др Александар Петровић, доцент
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет
ужа научна област: Наука о врењу