

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

020-3101
25.10.2012 ОБРАЗАЦ 6.

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

мр Александра Велићански

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију Комисија је именована на LXXX редовној седници Наставно-научног већа Технолошког факултета, 14.09.2012. године.</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>Председник: др Јасна Чанадановић-Брунет, редовни професор, Примењене инжењерске хемије, 15.05.2008., Технолошки факултет у Новом Саду Члан: др Драгољуб Цветковић, доцент, Биотехнологија, 25.02.2010., Технолошки факултет у Новом Саду; ментор Члан: др Драгана Четојевић-Симин, научни сарадник, Биологија, 07.07.2010., Природно математички факултет у Новом Саду Члан: др Драгиша Савић, редовни професор, Прехрамбено-биотехнолошка, 31.03.2008., Технолошки факултет у Лесковцу.</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Александра, Слободан, Велићански</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 13.10.1980., Рума, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: Технолошки факултет, Нови Сад, 01.09.2008. Карактеристике комбуха ферментација на лековитом биљу фамилије Lamiaceae</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: Технолошко инжењерство</p>
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
<p>„КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ФУНКЦИОНАЛНОГ НАПИТКА ОД МЕЛИСЕ (<i>Melissa officinalis</i> L.) ДОБИЈЕНОГ ФИЗИОЛОШКОМ АКТИВНОШЋУ ЧАЈНЕ ГЉИВЕ“</p>

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.

Докторска дисертација мр Александре Велићански је веома прегледно и јасно изложена у шест поглавља:

- Увод (стр. 1-2),
- Општи део (стр. 3-45),
- Материјал и методе (стр. 46-55),
- Резултати и дискусија (стр. 56-108),
- Закључак (стр. 109-110),
- Литература (стр. 111-122).

Дисертација је написана на 122 стране А4 формата, са 39 слика и 30 табела, цитирано је 214 литературна навода, а на крају су дате кључне документацијске информације са кратким изводом на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. поглавље (Увод) – Кандидаткиња у Уводу указује на значај комбухе, традиционалног напитка који се добија ферментацијом заслаћеног црног или зеленог чаја помоћу чајне гљиве. Напитку се приписују бројна лековита својства као што су: утицај на метаболичке поремећаје организма, дигестивни систем, реуматизам, хемороиде, псоријазу, нервни систем, канцерогена обољења, повишен крвни притисак, артритис, имунолошки систем, итд.. Међутим, већина терапеутских својстава комбухе нису научно доказана већ су изведена на основу искустава дугогодишњих конзументата.

Кандидаткиња наводи да се досадашње проучавање чајне гљиве и комбухе највећим делом односило на микробиологију чајне гљиве и хемијски састав напитка. Познато је да чајна гљива представља заједницу аутохтоних врста квасаца и бактерија сирћетног врења (БСВ), чији је микробиолошки састав одређен климатским и географским условима култивације. Присуство бактерија млечне киселине (БМК) у комбуха култури и напитку најчешће није био предмет истраживања, нити у литератури има података о инокулисању ферментационе течности или готовог комбуха напитка БМК у циљу добијања напитка побољшаних функционалних карактеристика.

Кандидаткиња истиче да се као традиционалне подлоге за култивацију чајне гљиве користе сахарозом заслаћен црни или зелени чај (*Camellia sinensis* L.), док се биљни чајеви не могу самостално користити за култивацију чајне гљиве. Наиме, биљни чајеви за разлику од црног или зеленог чаја не садрже довољне количине пуринских једињења која су значајни нутријенти за микроорганризме чајне гљиве. Међутим, чајна гљива је успешно култивисана и на заслаћеном чају неких лековитих биљака као што су ехинацеа, ртањски чај, мајчина душица и мелиса.

Предмет истраживања ове докторске дисертације је комбуха добијена ферментацијом заслаћеног чаја мелисе (*Melissa officinalis* L.) и њене функционалне карактеристике, као напитка побољшаних биолошких својстава у односу на комбуху од црног чаја. У Уводу се истиче да је рад на извођењу ове докторске дисертације обухватио „*in vitro*“ испитивање и карактеризацију антибактеријске, антиоксидативне и антипролиферативне активности комбухе од мелисе. Наводи се да је антибактеријска активност комбухе од мелисе испитана према сојевима Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија изолованим из воде за пиће и намирница (тзв. дивљи сојеви), као и према одабраним сојевима БМК. У досадашњим истраживањима антимицробне активности комбуха напитака су као тест микроорганизми углавном коришћени референтни сојеви, тако да је отворено питање о инхибиторном деловању комбухе на сојеве микроорганизама који су изоловани из хране, воде и окружења, а представљају контаминанте и/или микроорганризме од здравственог значаја. Поред тога, не постоје подаци о антимицробном деловању комбухе на БМК које су као део интестиналне бактеријске популације врло значајне за опште здравствено стање људског организма. У Уводу се даље истиче да је у оквиру ове докторске дисертације испитана антиоксидативна активност ферментационе течности и комбуха напитака од мелисе и црног чаја, као и чајних напитака на хидроксил и ДППХ радикале, а антипролиферативне активности готовог комбуха напитка од мелисе на раст одабраних ћелијских линија (епителног карцинома цервикса, аденокарцинома дојке и аденокарцинома дебелог црева). Да би се дефинисале активне компоненте напитка које су носиоци биолошке активности, у узорцима ферментационе течности одређен је садржај укупних фенолних једињења, као и њихов квалитативни и квантитативни састав током ферментације. Кандидаткиња као циљ докторске дисертације даље наводи испитивање и

могућности инкорпорирања бактерија млечне киселине у комбуха културу. У том смислу је ферментациона течност током култивације чајне гљиве инокулисана комерцијалним стартер културама и сојевима *Lactobacillus* sp. изолованим из сира, кајмака и киселог теста. Током ферментације је праћено преживљавање ћелија БМК, као и њихова физиолошка активност, тј. продукција млечне киселине (L- и D- облика) као биолошки значајних једињења. Кандидаткиња указује и да је део испитивања изведен у циљу испитивања присуства евентуалних страних микроорганизама у чајној гљиви (пored квасаца и БСВ) која је у раду коришћена као радна култура. Том приликом су из две чајне гљиве истог географског порекла изолована три соја БСВ чија је идентификација изведена PCR (Polimerase Chain Reaction) методом.

2. поглавље (Преглед литературе) – Поглавље Преглед литературе се састоји из пет делова. Кандидаткиња детаљно анализира микробиолошки састав чајне гљиве и специфичност ове заједнице квасаца и БСВ. Описане су физиолошке карактеристике квасаца и дат преглед врста квасаца које су изоловане из чајних гљива и комбуха напитака различитог географског порекла. Посебну пажњу кандидаткиња посвећује физиолошким карактеристикама и таксономији БСВ која још увек није у потпуности дефинисана. Последњих деценија се у циљу идентификације БСВ и њихове таксономске класификације користе молекуларне технике попут PCR методе. Кандидаткиња је детаљно описала PCR методу која је у експерименталном раду ове докторске дисертације коришћена за идентификацију изолованих сојева БСВ.

У другом делу овог поглавља описани су услови и састав подлога за култивацију, уз детаљан приказ до сада коришћених извора угљеника, извора азота и комплексних извора (сурутке и пастеризовано млеко). Детаљно је описан хемијски састав и биолошка активност екстракта мелисе која је због таквих својих карактеристика и лековитости одабрана као медијум за култивацију чајне гљиве.

У трећем делу овог поглавља кандидаткиња даје преглед једињења која улазе у састав комбуха напитака, како метаболита чајне гљиве (сирћетне киселине, глуконске и глукуронске киселине, етанола, витамина, и др.), тако и једињења пореклом из подлоге, пре свих, преосталих угљених хидрата (глукозе, фруктозе и сахарозе).

У четвртном делу поглавља Преглед литературе кандидаткиња најпре представља концепт функционалне хране, а затим и значај комбухе као функционалног напитка при чему износи досадашња сазнања о потенцијалним терапеутским својствима комбухе. Кандидаткиња затим детаљније описује досадашња научна сазнања о антимикробној, антиоксидативној и антиканцерогеној активности комбухе, односно, црног и зеленог чаја, представљајући и претпостављење механизме деловања највероватнијих активних компоненти напитка: глукуронске киселине, 1,4-сахаролактона, сирћетне киселине и др.

У последњем делу овог поглавља описан је значај бактерија млечне киселине како из производног, тако и из здравственог угла као пробиотика и као продуцера биолошки важних једињења.

Свако од обрађених питања поткрепљено је бројним литературним наводима, на основу којих је мр Александра Велићански била у могућности да правилно анализира и објасни добијене резултате и да их упореди са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици.

3. поглавље (Материјал и методе) – Кандидаткиња најпре описује поступак идентификације бактерија сирћетног врења PCR методом. Даље описује припрему подлога за култивацију чајне гљиве од мелисе и црног чаја, начине инокулације подлога и услове култивације. Прецизно описује поступак припреме суспензија БМК (комерцијалних стартер култура и изолата *Lactobacillus* sp.) које су коришћене за саплементну инокулацију ферментационе течности током култивације чајне гљиве. Кандидаткиња наводи методе које су примењене у раду за одређивање: вредности рН, титрабилне киселости, садржаја укупних фенолних једињења (метода по Folin-Ciocalteu), идентификацију и квантификацију фенолних једињења (High Performance Liquid Chromatography – HPLC методом), садржаја L- и D-млечне киселине (ензимским тестом). Затим даје приказ микробиолошких метода за одређивање броја квасаца, бактерија сирћетног врења, бактерија млечне киселине и страних микроорганизама у ферментационој течности. Детаљно и јасно описује се поступак испитивања антибактеријске активности комбухе од мелисе агар-дифузионом методом (метод "бунарчића") и начин припреме узорка (комбухе и одговарајућих контролних узорка) и тест микроорганизама (бактеријских изолата). Антиоксидативна активност ферментационих течности, комбуха и чајних напитака од мелисе и црног чаја испитана је применом електрон спин резонантне (ESR) спектрометрије на реактивне хидроксил и стабилне ДППХ радикале. Антипролиферативна активност комбуха и чајног напитка од мелисе на раст три хистолошки различите хумане ћелијске линије: карцинома грлића материце (HeLa), аденокарцинома дојке (MCF7) и аденокарцинома дебелог црева (HT-29) испитана је применом фотометријске методе (SRB тест).

Добијени резултати су на адекватан начин статистички обрађени. Резултати су приказани као средња вредност са стандардном девијацијом, а за резултате антибактеријске и антиоксидативне активности одређене су сигнификантне разлике између вредности помоћу ANOVA теста. Резултати испитивања антипролиферативне активности обрађени су помоћу двостраног t-теста са нивоом значајности од најмање 0,05.

4. поглавље (Резултати и дискусија) – Резултати испитивања предвиђени задацима докторске дисертације, као и њихово тумачење су систематизовано и јасно приказани на 26 слика и у 22 табеле, а поглавље је подељено на 5 целина. Кандидаткиња је најпре приказала резултате испитивања присуства страних микроорганизама (како БМК тако и страних бактерија и плесни - контаминаната) у чајној гљиви која је употребљена као радна култура у експерименталном раду ове докторске дисертације. Након тога приказани су и резултати идентификације бактерија сирћетног врења изолованих из чајних гљива са различитих локалитета PCR методом, који су поређени са референтним сојем *Acetobacter aceti* из колекције ATCC (American Type Culture Collection). Приказани резултати представљају величине умножених ДНК фрагмената добијених са два прајмера, као и величине фрагмената добијених након дигестије PCR продуката са четири рестрикциона ензима. Кандидаткиња је затим приказала резултате одређивања основних физичко-хемијских и хемијских (вредности рН и титрабилне киселости) и микробиолошких параметара (број ћелија квасаца и бактерија сирћетног врења) током комбуха ферментације заслађеног чаја мелисе и црног чаја.

Докторанткиња затим даје резултате испитивања функционалних карактеристика комбуха напитка од мелисе: антибактеријске, антиоксидативне и антипролиферативне активности. Антибактеријска активност комбухе од мелисе конзумне и више киселости, као и контролних узорака испитана је према 11 бактеријских изолата из намирница и воде, два изолата бактерија млечне киселине и једној starter култури БМК. Антиоксидативна активност узорака (ферментационих течности и конзумних комбуха напитака од мелисе и црног чаја, као и чајних напитака од мелисе и црног чаја) је одређена применом два модел система: система са стабилним ДППХ и реактивним хидроксил радикалима применом ESR спектрометрије, уз одређивање вредности EC_{50} . У даљем току испитивања функционалних карактеристика кандидаткиња анализира резултате испитивања антипролиферативне активности комбухе и чајног напитка од мелисе на три линије канцерогених ћелија: карцинома грлића материце (HeLa), аденокарцинома дојке (MCF7) и аденокарцинома дебелог црева (HT-29). Детаљна анализа и дискусија ових резултата је извршена поређењем са литературним наводима из области антимикробне, антиоксидативне и антипролиферативне активности комбухе и одговарајућих чајних напитака.

У узорцима чајних напитака, ферментационе течности и комбуха напитака од мелисе и црног чаја (за које је одређена и антиоксидативна активност) је спектрофотометријском методом утврђен садржај укупних фенолних једињења, док је HPLC методом испитан њихов квантитативан и квалитативан састав. Кандидаткиња детаљно анализира добијене резултате у функцији потенцијалних носилаца биолошке активности комбуха напитака од мелисе и црног чаја, као и разлога повећане антиоксидативне активности комбухе од мелисе у односу на комбуху од црног чаја.

У последњем делу поглавља Резултати и дискусија кандидаткиња је приказала резултате испитивања вијабилности и ферментативне активности БМК (комерцијалних starter култура и *Lactobacillus* изолата из ферментисаних млечних производа) које су додате у ферментациону течност током култивације чајне гљиве. Током симултане комбуха и млечно-киселинске ферментације праћени су физичко-хемијски и хемијски (рН, титрабилна киселост, садржај Л- и Д-млечне киселине) и микробиолошки (број квасаца, бактерија сирћетног врења и БМК) параметри. На основу резултата о способности преживљавања различитих сојева БМК током комбуха ферментације, као средини која није повољна за раст и размножавање БМК, кандидаткиња анализира могућност добијања комбухе са БМК као напитка побољшаних функционалних карактеристика.

У обављеној анализи резултата кандидаткиња је испољила велико теоретско знање, вешто је користила бројне податке из цитиране литературе упоређујући их са резултатима сопствених истраживања, а уочене појаве успешно је објаснила у духу савремених истраживања из области комбуха ферментације, биолошке активности комбуха напитка и млечно-киселинске ферментације, да би на крају изнела и валидне закључке.

5. поглавље (Закључак) - Закључци су веома добро изведени из добијених резултата и њихове дискусије, те се могу сматрати поузданим.

б. поглавље (Литература) – Литературни наводи обухватају све савремене аспекте везане за ферментацију и квалитет комбуха напитака, биолошку активност комбуха напитака и одговарајућих чајева, бактерије млечне киселине и молекуларне методе за идентификацију бактерија сирћетног врења, а цитирани су на умешан и правилан начин.

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

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ИСИ листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

M 21

Četojević-Simin D.D., Velićanski S.A., Cvetković D.D., Markov L. S., Mrđanović Ž.J., Bogdanović V. V., Solajić V.S. (2012): Bioactivity of Lemon Balm Kombucha. Food Bioprocess Technol, 5: 1756-1765 (SCI oblast: Food Science and Technology, 26/118).

M52

Александра С. Велићански, Драгољуб Д. Цветковић, Синиша Л. Марков, Јована Ј. Урошев и Бранимир М. Павлић (2010): Примена сојева бактерија млечне киселине у комбуха ферментацији, Прехрамбена индустрија, 21 (1-2), 69-75.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У чајној гљиви која је коришћена као радна култура у раду није детектовано присуство бактерија млечне киселине (лактокока и лактобацила), нити су детектоване стране бактерије и плесни – контаминанти радне културе.

Из две чајне гљиве истог географског порекла, а различитог локалитета изолована су три соја бактерија сирћетног врења (А-3/2, N-3/1 и V/3) који су идентификовани PCR методом. После дигестије PCR производа умноженог са 16S rDNK прајмером са четири рестрикциона ензима (AluI, HhaI, RsaI и HaeIII), утврђено је да изолати БСВ из комбухе не припадају врсти *Acetobacter aceti*, већ да највероватније изолати А-3/2 и N-3/1 припадају врсти *Gluconobacter oxydans*, а изолат V/3 врсти *Gluconacetobacter hansenii*. Ове резултате потврђује и рестрикциона анализа PCR производа са its 1 прајмером, која додатно указује да се ради о другачијим сојевима *Gluconobacter oxydans* и *Gluconacetobacter hansenii* од оних цитираних у литератури.

Комбуха напици од мелесе различите титрабилне киселости (оптималне од 4,44 г/л и већих вредности од 6,29 и 8,12 г/л), топлотно денатурисани комбуха напици и одговарајући раствори сирћетне киселине показали су изражену антибактеријску активност према свим одабраним изолатима Грам-негативних бактеријама. Изолати Грам-позитивних бактерије су показали мању осетљивост према комбухи и контролним узорцима у односу на Грам-негативне бактерије, што се може објаснити разликама у структури ћелијског зида двеју бактеријских група.

Носилац антибактеријске активности комбухе од мелесе је сирћетна киселина, чији садржај у комбухи одређује степен антибактеријске активности. Међутим, на постојање и других антибактеријских компоненти у напитку поред сирћетне киселине указује бактериостатско деловање неутралисаних комбухе према неким тест микроорганизмима (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* и *Salmonella* sp.) и бактериостатско деловање чајног напитка од мелесе према *Enterobacter cloacae* и *Proteus* sp.

Комбуха напици од мелесе и контролни узорци нису испољили антибактеријску активност према одабраним изолатима бактерија млечне киселине и комерцијалној стартер култури. Одсуство инхибирајућег деловања према бактеријама млечне киселине указује на потенцијално селективно деловање комбуха напитака на микроорганизмима, тј. бактерије које колонизују дигестивни тракт људи.

Садржај укупних фенолних једињења у чајном напитку од мелесе већи је у односу на црни чај. Током комбуха ферментације садржај фенолних једињења се мења нелинеарно и у ферментационој течности са мелисом већи је од 2,5-2,9 пута у односу на садржај у ферментационој течности са црним чајем. Висок садржај фенолних једињења чини заслађени чај мелесе адекватном подлогом за комбуха ферментацију која обезбеђује довољне количине нутријената микроорганизмима чајне гљиве.

Главна фенолна компонента детектована HPLC анализом током комбуха ферментације на подлози

са мелисом је рузмаринска киселина, а остале компоненте чија је концентрација знатно мања су: кафена, хлорогенска, ферулна киселина и кверцетин. У ферментационој течности са црним чајем доминантна фенолна компонента је катехин, а следеће по заступљености су: гална киселина, епикатехин, рутин и кумарна киселина.

Антиоксидативна активност узорака ферментационих течности и комбуха напитака од мелисе према хидроксил радикалима већа је у односу на чајни напиток и повећава се током ферментације. Према ДППХ радикалима, чајни напиток од мелисе показује већу максималну антиоксидативну активност у односу на остале узорке, али је прерасподела активности при нижим примењеним количинама узорака различита.

Антиоксидативна активност узорака ферментационих течности и комбуха напитака од црног чаја према хидроксил радикалима већа је у односу на чајни напиток од црног чаја и не мења се значајно током ферментације. Према ДППХ радикалима, активност чајног напитка од црног чаја једнака је или већа од активности осталих узорака.

На основу EC_{50} вредности, антиоксидативна активност конзумних комбуха напитака од мелисе и црног чаја према ДППХ радикалима већа је од активности чајних напитака. Ферментациона течност и комбуха напиток од мелисе имају већу антиоксидативну активност на оба испитивана радикала у односу на узорке са црним чајем, што се може приписати већем садржају фенолних једињења током ферментације подлоге са мелисом.

Конзумни комбуха напиток од мелисе и чајни напиток нису стимулисали пролиферацију ћелијских линија хуманих карцинома: HeLa (епителни карцином грлић материце), HT-29 (адено-карцином дебелог црева) и MCF7 (аденокарцином дојке), при концентрацијама изнад 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ни један од узорака није показао ефекат инхибиције раста од 50%. Највећи утицај и највећа разлика у активности чајног и комбуха напитка уочена је за HeLa ћелијску линију, где је EC_{20} за чајни напиток постигнута са концентрацијом 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Комбуха од мелисе инхибира раст MCF7 ћелијске линије за око 10% при концентрацији од 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Чајни и конзумни комбуха напиток од мелисе не утицала на раст HT-29 ћелијске линије.

Додатак комерцијалних стартер култура бактерија млечне киселине (MY-1821 и MY-721) у ферментациону течност 48 сати од почетка ферментације није утицао на уобичајене промене вредности рН, титрабилне киселости и броја ћелија чајне гљиве током комбуха ферментације. Током ферментације се број бактерија млечне киселине из стартер култура (лактобацила, стрептокока и бифидобактерија) смањивао због неповољних услова током комбуха ферментације. Упркос томе, садржај Л- и Д- млечне киселине се током ферментације повећавао као последица активности бактерија млечне киселине. Л- облик млечне киселине је био доминантан током читавог периода култивације, а њен садржај у напицима је био 66,96 мг/л, односно, 54,75 мг/л у зависности од примењене стартер културе. Упркос слабој одрживости ћелија бактерија млечне киселине садржај млечне киселине у напицима са додатим стартер културама је већи него у напитку добијеном од заслађеног црног чаја.

Додатак изолата *Lactobacillus* sp. пореклом из традиционалних ферментисаних производа (сир, кајмак, кисело тесто) 48 сати од почетка ферментације такође није утицао на промене физичко-хемијских и микробиолошких параметара комбуха ферментације. Током комбуха ферментације највећу вијабилност показао је изолат *Lactobacillus hilgardii* пореклом из киселог теста, чији се број није мењао ни током десетодневног чувања готовог напитка на +4°C. Висок степен отпорности овог изолата може се довести у везу са његовим пореклом и способношћу преживљавања у срединама са ниском рН вредношћу, у конзорцијуму са другим микроорганизмима.

Додатком изолата *Lactobacillus* sp. се садржај Л- и Д- млечне киселине у ферментационим течностима повећао скоро три пута у односу на традиционални напиток. Највећу количину млечне киселине (247,6 мг/л Д- и 95,5 мг/л Л-млечне киселине) је продуковао сој *Lactobacillus plantarum* пореклом из кајмака, упркос мањој вијабилности у односу на сој *Lactobacillus hilgardii*. Ово указује да степен продукције млечне киселине током симултане млечно-киселинске и комбуха ферментације не мора бити одређен бројношћу ћелија бактерија млечне киселине.

Способност преживљавања ћелија бактерија млечне киселине током комбуха ферментације и у готовом напитку током чувања, као и способност продукције значајније количине пре свега Л-млечне киселине, уз евентуалне пробиотске карактеристике сојева, јесу кључни фактори њиховог одабира за употребу током култивације чајне гљиве у циљу добијања комбухе повећане функционалне вредности.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Добијени резултати су проистекли из веома обимних, оригинално постављених лабораторијских испитивања функционалних карактеристика комбуха напитка од мелисе: антибактеријске, антиоксидативне и антипролиферативне активности, као и испитивања утицаја бактерија млечне киселине на комбуха ферментацију. Резултати ових истраживања су систематично, јасно и прегледно приказани и дискутовани. Тумачење резултата заснива се на најновијим доступним научним сазнањима из области биотехнолошких процеса и биолошке активности функционалних напитака те се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Дисертација је у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме, а у односу на неке постављене циљеве урађена су и шира испитивања.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација мр Александре Велићански представља оригиналан допринос науци јер је веома комплексним истраживањем доказано да комбуха добијена ферментацијом заслаћеног чаја мелисе поседује изражене функционалне карактеристике. Доказана је антибактеријска активност комбухе према изолатима из намирница и воде за пиће који као такви поседују већу отпорност према еколошким факторима (међу њима и на антимикуробне агенсе), а представљају потенцијалне контаминанте комбухе. Испитивање антимикуробне активности комбухе од мелисе на бактерије млечне киселине је показало отпорност ових бактерија које су значајан део интестиналне микрофлоре, што је први показатељ селективног деловања напитка на цревне бактерије. Доказано је и да је антиоксидативна активност према ДППХ и хидроксил радикалима комбуха напитка од мелисе израженија од активности чајног напитка од мелисе, као и да је већа од антиоксидативне активности традиционалне комбухе од црног чаја. Антиоксидативна активност комбуха напитака је испитана применом најсавременије методе за детекцију слободних радикала - ESR спектроскопије. У испитивању антипролиферативне активности конзумног комбуха напитка и чајног напитка од мелисе на три ћелијске линије хуманих карцинома: HeLa (епителни карцином цервикса), MCF7 (аденокарцином дојке) и HT-29 (аденокарцином дебелог црева) утврђено је да није дошло до пролиферације испитаних ћелијских линија, при концентрацијама већим од 100 µg/ml. На основу резултата кандидаткиња је претпоставила да су активне компоненте, носиоци испитаних функционалних карактеристика комбухе од мелисе, с једне стране супстанце пореклом из саме биљке (пре свих рузмаринска киселина), а с друге метаболити чајне гљиве продуковани током култивације (органске киселине, витамини и др. У дисертацији мр Александре Велићански први пут је испитана вијабилност и физиолошка активност бактерија млечне киселине (стартер култура и изолата из ферментисаних производа) током симултане млечно-киселинске и комбуха ферментације. Ови резултати су значајни као показатељи евентуалног коришћења и селекције сојева бактерија млечне киселина у циљу добијања комбухе побољшаних функционалних карактеристика. У овој дисертацији први пут је примењена савремена молекуларна метода - ланчана реакција полимеразе (PCR) за идентификацију бактерија сирћетног врења изолованих из чајних гљива са нашег поднебља. Поуздана идентификација како бактерија сирћетног врења тако и квасаца изолованих из чајне гљиве јесте први корак у њиховом коришћењу као стартер култура за комбуха ферментацију.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Недостаци дисертације нису уочени

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене докторске дисертације мр АЛЕКСАНДРЕ ВЕЛИЋАНСКИ, Комисија са задовољством предлаже да се прихвати ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ, а кандидаткињи одобри одбрана овог рада.

Нови Сад, 18.10.2012. год.

др Јасна Чанадано

др Др

др Драгана Четоје