

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

мр Драгољуба Цветковића

I	ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1.	Датум и орган који је именовео комисију Комисија је именована на XXIV редовној седници Наставно-научног већа Технолошког факултета, 06.06.2008. године.
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: Председник: др Ева Лончар , ред. проф. Технолошког факултета у Новом Саду; аналитичка хемија; 11.01.2002. Члан: др Синиша Марков , ванр. проф. Технолошког факултета у Новом Саду; технолошка микробиологија; реизбор 06.12.2007. Члан: др Јасна Чанадановић-Брунет , ред. проф. Технолошког факултета у Новом Саду; органска хемија; 15.05.2008. Члан: др Виктор Недовић , ванр. проф. Пољопривредног факултета у Земуну; наука врењу; 27.2.2007.
II	ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1.	Име, име једног родитеља, презиме: Драгољуб, Димитрија, Цветковић
2.	Датум рођења, општина, република: 20.10.1971. године, Вршац, Србија
3.	Датум одбране, место и назив магистарске тезе: 19.09.2003. године; Технолошки факултет, Нови Сад Метаболичка активност чајне гљиве на различитим супстратима Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: прехрамбено-биотехнолошке науке, смер Микробиолошки процеси
III	НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Комбуха од лековитог биља – биолошка активност и параметри ферментације
IV	ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Навести кратак садржај са значком броја страна поглавља, слика, шема, графикона и сл. Докторска дисертација садржи 89 страна; 6 поглавља; 40 слика; 23 табеле 144 литературних цитата. 1. Увод (стр. 1-2) - изложен је опис научног проблема и кратак преглед владајућих истраживања у области настајања комбуха напитка и његових здравствених ефеката на конзументе. Дефинисана је хипотеза и циљеви рада. 2. Општи део (стр. 3-26) - садржи преглед и трендове у изучавању комбухе, детаљан приказ састава и начина деловања радне културе, тј. чајне гљиве, примењиваних подлога за биотрансформацију, поступака култивације, састава напитка и његове биолошке активности, односно антимикробних, антиоксидативних и антипролиферативних ефеката. 3. Материјал и методе (стр. 27-32) - садржи опис материјала који је коришћен за израду дисертације, поступка припреме подлоге и инокулума, као и детаљан опис примењених метода за микробиолошке анализе, за одређивање главних продуката ферментисане течности и садржаја неких фенолних једињења, методе за утврђивање

антиоксидативних и антипролиферативних својстава припремљених напитака од ехинацее и ртањског чаја.

4. **Резултати и дискусија** (стр. 33-77) – су подељени у две веће целине, а појединачно по резултатима садржи: дистрибуцију ћелија радне културе (добијену на традиционалан начин и применом стартер култура квасаца и бактерија сирћетног врења изолованих из локалне чајне гљиве) током процеса биотрансформације подлоге од ехинацее, биолошку, тј. антимикуробну, антиоксидативну и антипролиферативну активност комбуха напитака од ехинацее и ртањског чаја у поређењу са традиционалним напитком од црног чаја, ефекат варирања параметара подлоге (садржаја сахарозе и црног чаја) на брзину процеса и дефинисање математичког модела за scale-up процеса комбуха ферментације на основу специфичне мађуфазне површине. Приказани резултати испитивања, постављени у задацима докторске дисертације, детаљно су дискутовани у поређењу са литературним подацима.
5. **Закључак** (стр. 78-79) - садржи све закључке изведене из добијених резултата.
6. **Литература** (стр. 80-86) - садржи литературне наводе који обухватају све савремене аспекте добијања и испитивања комбухе као функционалног напитка који се може и индустријски производити.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. поглавље (Увод) – Јасно је изложен опис научног проблема и кратак преглед владајућих истраживања у области добијања комбухе од алтернативних подлога и вредновања њене биолошке активности, хипотеза и циљеви рада.
2. поглавље (Општи део) - Детаљно и прегледно су приказани трендови у изучавању састава радне културе, односно чајне гљиве, процеса биотрансформације подлоге, хемијског састава насталих напитака и њихових различитих својстава, као што су антимикуробна, антиоксидативна и антипролиферативна активност. Свако од обрађених питања поткрепљено је бројним литературним наводима.
3. поглавље (Материјал и методе) - Материјал који је коришћен за израду дисертације је детаљно и јасно описан. Примењене методе за припрему подлога и извођење процеса комбуха ферментација, као и методе које су коришћене за утврђивање микробиолошких и хемијских параметара су прецизно и поновљиво приказане. У раду су осим уобичајених и стандардних метода, коришћене и најсавременије инструменталне методе (HPLC i ESR спектрометрија) за одговарајућа одређивања.
4. поглавље (Резултати и дискусија) - Резултати испитивања предвиђени у задацима докторске дисертације, као и њихово тумачење су систематизовано и јасно приказани. Сви резултати који се односе на комбуха ферментације традиционалне подлоге и алтернативних извора (ехинацеа и ртањски чај), као и биолошка активност добијених напитака су прокоментарисани и поређени са директним и индиректним литературним подацима.
 - Најпре су приказани резултати дистрибуције ћелија радне културе у различитим нивоима подлоге за биотрансформацију, припремљене на различите начине, као и главних метаболита насталих током процеса комбуха ферментације на подлози од ехинацее.
 - Даља испитивања су текла у правцу утврђивања антимикуробне активности комбуха напитака конзумне киселости од ехинацее и ртањског чаја у односу на традиционални напиток од црног чаја.
 - За чајне и комбуха напитке конзумне киселости од лековитог биља, као што су различити делови ехинацее и ртањски чај, испитана је антиоксидативна активност применом два модел система: са стабилним DPPH радикалима и са реактивним хидроксил радикалима применом најсавременије методе, ESR спектрометрије. Ова метода је први пут примењена за овакве функционалне напитке, а добијени резултати су упоређени са активношћу традиционалног комбуха напитка. Према доступној литератури нема

података о ESR одређивању оваквих производа.

- Испитивања биолошке активности комбухе од лековитог биља се завршава са утврђивањем антипролиферативних својстава претходно наведених напитака на три линије канцерогених ћелија (HeLa, MCF-7 и HT-29). Добијени резултати представљају први корак у *in vitro* истраживањима таквих напитака, па су врло брзо добили и научну верификацију.

- Затим је утврђен ефекат доминантних органских компоненти подлоге на брзину процеса комбуха ферментације у биореакторима различитих односа запремина суда / запремина подлоге.

- На основу већег броја (11) биотрансформација различитих запремина подлоге од црног чаја изведених у биореакторима променљивих облика и димензија, изведен је математички модел за scale-up процеса комбуха ферментације на основу специфичне мађуфазне површине. Квалитет математичког модела је научно верификован и практично потврђен процесом са 90 литара подлоге у одговарајућем лабораторијском/полуиндустријском реактору, при чему је добијен напитака доброг квалитета, што је и први добијени резултат са таквом количином.

5. поглавље (Закључак) - Закључци наводе сазнања произашла из ове докторске дисертације и потврђују полазну хипотезу.

6. поглавље (Литература) – Наведени литературни наводи обухватају све саремене аспекте везане за ферментацију и квалитет комбуха напитака.

VI Списак научних и стручних радова који су објављени или прихваћени за објављивање на основу резултата истраживања у оквиру рада на докторској дисертацији

уз напомену: Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

P 51a

1. Cvetković D., Markov S., Djurić M., Savić D., Velićanski A. (2008): Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation, *Journal of Food Engineering*, 85, 387-392. (SCI област: Food Science and Technology, 20/96)

P54

1. Velićanski A., Cvetković D., Markov S. (2006): Optimization of medium with black tea for kombucha fermentation. 1. Source of C-atom, VIIIth International Symposium "Young people and multidisciplinary research", Temisoara, Romania, Proceedings on the CD ROOM, p. 663-671, ISBN (10) 973-8359-39-2, ISBN (13) 978-973-8359-39-0

2. Cvetković D., Velićanski A., Markov S. (2007): Optimization of medium with black tea for kombucha fermentation. 2. source of N – atom, 9th ISIRR Hungary-Romania-Serbia, 21-23.06.2007. Novi Sad, Proceedings on the CD ROOM

P 61

1. Цветковић Д, Марков С, Велићански А. (2005): Антимикробна активност комбухе од ртањског чаја, Хемијска индустрија 59 (9-10) 248-253.

2. Cvetković D., Markov S. (2005): Preparation of kombucha from winter savory (*Satureja montana* L.) in the laboratory bioreactor, *Acta Periodica Technologica*, 36, 187-196.

3. Cvetković D., Markov S. (2006): Producing kombucha beverage from winter savory (*Satureja montana* L.) tea inoculated by pellicle, *Acta Periodica Technologica*, 37, 119-130.

4. Mrđanović J., Bogdanović G., Cvetković D., Velićanski A., Četojević Simin D. (2007): The frequency of sister chromatid exchange and micronuclei in evaluation of cytogenetic activity of Kombucha on human peripheral blood lymphocytes: a pilot study, *Archive of Oncology*, 15, 3-4.

P 65

1. Цветковић Д, Марков С, Велићански А. (2006): Антимикробна активност комбухе од црног чаја и чаја ехинацеје, XI Саветовање о биотехнологији, Зборник радова vol. 11 књига II, 579-587.

2. Велићански А., Цветковић Д., Марков С., Савић Д. (2007): Утицај инокулума на добијање комбухе, XII Саветовање о биотехнологији, Зборник радова, 12.(13), 131-137.
3. Цветковић Д., Марков С., Велићански А., Чанадановић Брунет Ј., Петковић Г., Тумбас В. (2007): Добиање комбухе од ехинацее (*Echinacea purpurea* L.) – антиоксидативно деловање, XII Саветовање о биотехнологији, Зборник радова, 12.(13), 71-77.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

- Ћелије бактерија сирћетног врења су у подлози инокулираној целулозном навлаком најбројније у површинском делу, док су у подлози са starter културама равномерно заступљене у свим испитаним зонама подлоге.

- Број ћелија квасаца изолованих из аутохтоне чајне гљиве као starter култура од 10^5 ћелија/mL је довољан за успешну ферментацију заслаћеног чаја. Исти ред величине броја ћелија бактерија је недовољан за трансформисање подлоге у комбуха напиток. Лимитирајући фактор физиолошке активности бактерија током статичне комбуха ферментације је количина доступног ваздушног кисеоника у подлози.

- У ферментисаној течности која је инокулирана starter културама, на крају ферментације, је регистрована знатно већа количина етанола и знатно мања количина угљених хидрата (сахарозе, глукозе и фруктозе) у односу на подлогу која је инокулирана целулозном пеликулом. Ово је последица изузетне физиолошке активности чистих култура квасаца и бактерија сирћетног врења. Употребом starter култура добија се комбуха веће титрабилне киселости, за исто време култивације, у односу на традиционални поступак инокулације.

- Конзумни комбуха напици од црног и ртањског чаја и чаја ехинацее су показали готово идентично антимикуробно деловање на испитане бактерије, што значи да врста чаја и његове компоненте нису одлучујући фактор антимикуробне активности комбухе. Носиоци антимикуробне активности комбуха напитака су метаболити чајне гљиве синтетисани током култивације, пре свих сирћетна киселина. Међутим, с обзиром да су одређено антимикуробно деловање показали и узорци комбухе након неутралисања, може се претпоставити да носиоц антимикуробне активности комбухе није само сирћетна киселина. Комбуха напици су испољили активност на микроорганизме са прокариотским типом ћелије – бактерије *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus* sp. Структура ћелијског зида бактерија није пресудна за антимикуробно деловање комбухе имајући у виду да су узорци деловали и на Грам позитивне и на Грам негативне бактерије. *Penicillium aurantiogriseum* је био једини еукариотски микроорганизам на који су комбухе од црног и ртањског чаја и ехинацее показале граничну инхибиторну активност, поред чега је комбуха од ртањског чаја деловала и на *Aspergillus flavus*. Имајући у виду испољену активност напитака на потенцијалне контаминанте током култивације чајне гљиве, може се констатовати да се поштовањем минималних санитарно-хигијенских услова у домаћинству или производном погону, обезбеђује добијање комбухе без великог ризика од контаминације радне културе и напитка ентеробактеријама. Међутим, извесни ризик од контаминације плеснима и квасцима из околине постоји.

- Црни чај, чајни напици од корена и хербе ехинацее и њихови комбуха напици су испољили антиоксидативну активност на DPPH радикале. Чајни напици су при томе показали ниже вредности антиоксидативне активности у поређењу са конзумним комбуха напицима. Најизраженији антиоксидативни ефекат ($AA_{DPPH}=100\%$) на стварање и трансформацију DPPH радикала детектован је у присуству комбуха напитка припремљеног од хербе ехинацее. Чајни напиток од ртањског чаја и комбуха су поред активности на DPPH испољили антиоксидативну активност и према хидроксил радикалима. Чајни напици припремљени од ртањског чаја имају високе вредности и AA_{DPPH} и AA_{OH} , али те вредности су ниже у поређењу са антиоксидативном вредношћу одговарајућих комбуха напитака. Израженија антиоксидативна активност комбуха напитака у односу на одговарајуће чајеве је узрокована метаболитима који настају током култивације чајне гљиве (витамини В и С, кето карбонске киселина, катехини), а који утичу на настајање и трансформацију испитаних радикала и/или делују синергистички, како међусобно тако и са активним састојцима чајева.

- Комбуха напици од црног и ртањског чаја нису стимулисали пролиферацију ћелијских линија хуманих карцинома: HeLa (епителни карцином цервикса), MCF-7 (аденокарцином дојке) и HT-29 (аденокарцином дебелог црева). Чајни напици и конзумне комбухе од ртањског и црног чаја нису показали значајнију разлику у антипролиферативној активности, при чему ни један од узорака није показао ефекат инхибиције од 50%. Нешто већу активност у односу на HT-29 ћелије испољила је комбуха од црног чаја. Комбуха од ртањског чаја је вредност IC_{20} у случају ћелијске линије HeLa остваривала при нижим концентрацијама него водени екстракт биљке *Satureja montana*. Вероватно да комбуха од ртањског чаја дугује повећану антипролиферативну активност метаболитима чајне гљиве.

- Садржај сахарозе (у границама од 5-10 g/L) и црног чаја (3-4,5 g/L) није одлучујући за ефикасну ферментацију заслаћеног чаја чајном гљивом, већ су много значајније физиолошке карактеристике комбуха културе и иницијални број ћелија квасаца и бактерија сирћетног врења у подлози за култивацију. Пораст запремине супстрата у реактору за култивацију чајне гљиве, тј. смањење фактора $V_{суда}/V_{подлоге}$ води смањењу количине синтетисаних киселина и продужењу процеса ферментације. Могуће је да повећањем запремине

<p>подлоге, при статичним условима култивације, долази до смањења количине раствореног кисеоника по јединици запремине подлоге као једном од лимитирајућих фактора комбуха ферментације.</p> <p>- Специфична међуфазна површина (a) се може дефинисати као критична променљива комбуха ферментације и кључни параметар за извођење математичког модела за <i>scale-up</i> ферментације. Два реактора различитих геометријских карактеристика, уз услов да имају исте вредности специфичне међуфазне површине, ће највероватније за исто време трајања ферментације дати напитке истих сензорних карактеристика, тј. титрабилне киселости. Експериментални подаци добијени за ферментацију изведену у суду укупне запремине 110 L, а за пројектовану вредност a, су пуна потврда апликативности дефинисаног математичког модела за <i>scale-up</i> комбуха ферментације.</p>
<p>VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА</p> <p>НАПОМЕНА: Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.</p>
<p>Резултати испитивања су за сваки део, као и дисертацију у целини изнети систематично, јасно, прегледно приказани и интерпретирани. 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.</p>
<p>IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:</p> <p>НАПОМЕНА: 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.</p>
<p>1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме</p> <p>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.</p>
<p>2. Да ли дисертација садржи све битне елементе</p> <p>Дисертација садржи све битне елементе.</p>
<p>3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци</p> <p>Дисертација представља оригиналан допринос науци јер је први пут испитана биолошка (антимикробна, антиоксидативна и антипролиферативна) активност комбуха напитака конзумне киселости добијених од лековитог биља (ехинацеае и ртањског чаја). Поред тога, први пут је постављен математички модел за <i>scale-up</i> процеса који је и верификован извођењем биотрансформације 90 литара подлоге.</p>
<p>4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања</p> <p>Недостаци дисертације нису уочени.</p>
<p>X ПРЕДЛОГ:</p>
<p>На основу укупне оцене оцене докторске дисертације мр Драгољуба Цветковића Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном Већу Технолошког факултета и Сенату Универзитета у Новом Саду да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана овог рада.</p>

Нови Сад, 11.07.2008. год.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ