

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

**ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације  
Соње Пецић, дипл. инж.**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета бр. 290/5-6.3. од 25.02.2015., именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом „Утицај плодносног тела гљиве *Ganoderma lucidum* на хемијски састав и сензорне карактеристике специјалних ракија“, коју је поднела кандидаткиња Соња Пецић, дипл. инж.. Комисија у саставу: др Нинослав Никићевић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду; др Миомир Никшић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду; др Ида Лескошек-Чукаловић, редовни професор Пољопривредног факултета у Београду; др Предраг Вукосављевић, ванредовни професор Пољопривредног факултета у Београду; др Веле Тешевић, ванредни професор Хемијског факултета у Београду, на основу прегледа докторске дисертације подноси следећи:

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Докторска дисертација Соње Пецић, дипл. инж. под насловом „УТИЦАЈ ПЛОДНОСНОГ ТЕЛА ГЉИВЕ *Ganoderma lucidum* НА ХЕМИЈСКИ САСТАВ И СЕНЗОРНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ СПЕЦИЈАЛНИХ РАКИЈА“, написана је према Упутству за обликовање штампане и електронске верзије докторске дисертације Универзитета у Београду, на 196 нумерисаних страна, у оквиру којих се налази 37 табела, 3 графика, 4 фигуре и 19 слика. У докторској дисертацији су цитиране и у литератури наведене 202 референце. Поред уводних садржаја (*насловне стране на српском и енглеском језику; стране са списком чланова комисије; посвете; стране са изразима захвалности; стране са апстрактном на српском и енглеском језику; садржаја*), докторска дисертација има седам нумерисаних поглавља: **1 - Увод** (1-2. стр.); **2 – Општи део** (3-50.); **3 – Научни циљ истраживања** (50.); **4 – Експериментални део** (51-90.); **5 – Резултати и дискусија** (91-165.); **6 – Закључак** (166-171.); **7 – Литература** (172-191.); докторска дисертација садржи и **8 - страну са биографијом кандидаткиње; и скениране попуњене и потписане изјаве дате као Прилог 1, 2 и 3.**

## 2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

У првом поглављу – Увод – кандидаткиња наглашава да гљива *Ganoderma lucidum* спада у групу медицинских гљива које су нејестиве због своје грубе и тврде текстуре и горког укуса. Посебно истиче да плодносно тело ове гљиве обилује биоактивним компонентама: полисахаридима, терпеноидима, аминокиселинама, док у мањим количинама садржи протеине, стероиде, липиде, алкалоиде, аденозин, рибофлавин, аскорбинску киселину, неорганске јоне (Mg, Ca, Zn, Mn, Fe, C) и органски везан германијум.

Препарати са гљивом *Ganoderma lucidum* припремају се у облику екстраката у врућој води, концентрата, раствора и праха који се даље употребљавају за производњу тоника, тинктура, чајева, супа и биљних формула. Кандидаткиња наглашава да екстракцијом у алкохолним растворима (пићима) се постиже ефикаснија композиција и повећава растварање биолошки активних материја у поређењу са екстракцијом у воденом раствору. Такође, алкохолна пића побољшавају циркулацију крви и поспешују куративни ефекат.

Наглашава се да на тржишту постоји велики број течних фармаколошких препарата на бази биља и гљива, у којима се етанол користи као растварач (и до 80%), који се користе, како за превенцију тако и за лечење појединих болести. Кандидаткиња примећује да је због својих карактеристика, *G. lucidum* нашла широку примену за развој нових производа са повећаним функционалним својствима и да на основу наведених карактеристика *Ganoderma lucidum* представља интересантну сировину за производњу алкохолних пића.

У другом поглављу – Општи део - У овом делу кандидаткиња исцрпно представља научна сазнања која су подељена у пет подпоглавља са адекватним литературним изворима из области проучавања дисертације.

У потпоглављу 2.1. кандидаткиња представља опште карактеристике гљиве *Ganoderma lucidum*, где описује њену интересантну прошлост и медицинску употребу у древним земљама Далеког истока. Представљени су начини вештачке култивације због њене реткости у природи, али и све веће потражње која расте из године у годину, а процењује се на неколико хиљада тона годишње. Важност ове гљиве види се и у чињеници да се на светском тржишту већ пре две деценије могло наћи више од 90 брендова различитих производа на бази *Ganoderma lucidum*.

Представљени су резултати истраживања хемијског састава гљиве *Ganoderma lucidum*. Кандидаткиња скреће пажњу на тритерпене, полифеноле и полисахариде, као најважније компоненте гљиве са биоактивним дејством. Наглашено је да *Ganoderma lucidum* обилује тритерпенима ланостанског типа и до сада је изоловано више од 140 различитих једињења овог типа из *G. lucidum*, и да је већина тритерпена изузетно горког укуса, а највећи део чине ганодеринске киселине.

Приказани су резултати вишегодишњих истраживања њених лековитих дејстава и терапеутске примене. Великим бројем студија доказана су бројна фармаколошка дејства *G. lucidum*: поседује имуномодулаторну и антиинфламаторну активност, делује као антиартеросклеротик, аналгетик, има хемопревентивна, антитуморна, радиопротективна, антибактеријска, антивирална (укључујући Анти-

ХИВ), хиполипидемијска, хепатопротективна, антиоксидативна и хипогликемијска својства, а позитивно делује и код дијабетеса, чира, успорава старење итд.

Кандидаткиња је детаљно представила резултате великог броја експеримента *in vitro* и на животињама и људима (*in vivo*) у којима је доказано да хемијске компоненте изоловане из гљиве *Ganoderma lucidum*, у највећем броју полисахариди, полифеноли и тритерпеноиди, имају антиканцерогено дејство, антиоксидативно, антимикубно и имуномодулаторско дејство.

У **потпоглављу 2.2.** су окарактерисана јака алкохолна пића са посебним освртом на воћне ракије (шљивовица), грожђане ракије и полуфабрикате (лозовача и вински дестилат) и житни алкохол, која су коришћена као алкохолне основе (медијуми) за производњу специјаних ракија са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*. Поред дефинисања њихових сезонских карактеристика и хемијског састава прописаних Правилником, описан је и технолошки поступак њихове производње и његов утицај на квалитет јаких алкохолних пића.

**Потпоглавље 2.3.** је кратак приказ испарљивих састојака шљивове препеченице, лозоваче, винског дестилата и житног алкохола, са посебним освртом на ароматичне материје, њихово порекло и време настајања.

У **потпоглављу 2.4.** представљен је историјат употребе ароматичног и лековитог биља за производњу траварица. Важност биља дефинисана је и чињеницом да се 20 хиљада биљака користи за медицинску употребу, које у људској исхрани има позитиван ефекат на здравље конзумента. Најзначајнији ефекти биља на људски организам су антиоксидативни, стимулација дигестивног система, анти-инфламаторно, антимикубно, хиполипидемијско, антимулагено и антиканцерогено дејство.

Преглед досадашњих малобројних истраживања која се односе на ефекат додатка гљиве у алкохолна пића представљен је у **потпоглављу 2.5.** Кандидаткиња разматра чињеницу да екстрахована једињења гљиве међају сензорне карактеристике алкохолних пића (боју, мирис и укус), али и повећавају функционална својства, јер гљива садржи биолошки активне компоненте. Кандидаткиња наглашава да иако се неколико хиљада година ова гљива користи као сировина за производњу јаких алкохолних пића, уочљив је недостатак истраживања која се баве испитивањем промене хемијског састава јаких алкохолних пића додатком гљиве *Ganoderma lucidum*, као и њиховим биолошким дејством.

У **трећем поглављу - Научни циљ истраживања** – кандидаткиња истиче да је циљ дисертације био да се утврди утицај гљиве *Ganoderma lucidum* на хемијски састав и сензорне карактеристике јаких алкохолних пића. Уједно и да се произведу специјална пића са повећаним садржајем полифенола и већим антиоксидативним капацитетом, као и оптимизација процеса у циљу добијања екстракта и алкохолних пића са највећим садржајем полифенолних једињења и са најбољим ароматским комплексом.

Један од циљева дисертације је био утврђивање антимикубних својстава добијених алкохолних екстраката и пића, методом дифузије са филтер дискова на различите сојеве микроорганизама због све учесталије појаве резистенције на антибиотике, као и испитивање функционалних својстава комплекса обогаћеног

полифенолним материјама гљива на оговарајуће ћелијске линије-HeLa ћелијских модела, Б и Т ћелијске линије.

Свака алкохолна основа одликује се специфичним сензорним карактеристикама, па је стога један од циљева био утврђивање најпогоднијег алкохолног медијума за производњу јаких алкохолних пића са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*. Требало је утврдити који од коришћених алкохолних медијума (вински дестилат, шљивовица, лозовача и траварица) имају најпогодније карактеристике за производњу мацерата гљиве *Ganoderma lucidum*.

Екстракцијом једињења гљиве долази до промена хемијског састава пића, па је у раду био циљ да се дефинише угљенохидратни састав добијених пића и екстракта, као и утврђивање квалитативних и квантитативних промена у ароматском и хемијском комплексу током поступка сазревања специјалних траварица и нових врста јаких алкохолних пића са додатком екстракта гљиве *Ganoderma lucidum*. Утврђивала се и могућност коришћења екстракта ове гљиве за убрзано сазревање јаких алкохолних пића.

**Четврто поглавље** се односи на детаљан приказ **Експерименталног дела** који приказује материјал и методе који су коришћени током израде докторске дисертације. Ово поглавље се састоји од 16 подпоглавља: *Анализа гљиве Ganoderma lucidum*; *Алкохолни медијуми*; *Ароматично и лековито биље*; *Екстракција алкохолних медијума*; *Одређивање укупних фенола у екстрактима*; *Одређивање антиоксидативне активности*; *Одређивање боје екстракта и пића са додатком Ganoderma lucidum*; *Одређивање  $\beta$ -глюкана екстракта*; *HPLC анализа шећера екстракта*; *LC- MS i HPLC/DAD анализа екстракта печурака и јаких пића са додатком печурке*; *GC-MS анализа ароматског комплекса пића*; *Антимикробна анализа*; *Сензорна анализа јаких пића обогаћених Ganoderma lucidum и екстрактом биља*; *Анализа антиканцерогеног дејства комплекса обогаћених Ganoderma lucidum*; *Поступак испитивања антиполиферативног потенцијала комплекса обогаћених Ganoderma lucidum*; *Статистичка обрада података*.

У експерименталном делу дат је приказ материјала, који је коришћен за производњу узорака екстракта и пића са гљивом *Ganoderma lucidum*, и детаљно је приказан поступак производње наведених узорака. За производњу екстракта и алкохолних пића коришћено је суво плодно тело гљиве *Ganoderma lucidum* GL-I из колекције за технолошку микробиологију Пољопривредног факултета у Београду, а изолована је у околини Београда. Кандидаткиња наводи да је гљива уситњена сецкањем или млевењем на млину за кафу, а затим су анализирани следећи параметри гљиве *Ganoderma lucidum*: садржај воде, сирових протеина, сирове масти, укупних шећера и укупног пепела. За производњу пића са додатком гљиве коришћена је лозова препеченица произведена на огледном добру Радмиловац Пољопривредног факултета, шљивова препеченица локалног произвођача из александровачког округа, село Старци и вински дестилат индустријске производње фабрике „Вршачки виногради“ - Вршац. Кандидаткиња наводи да су за квантитативну хемијску анализу алкохолних медијума коришћене стандардне методе (Сл. лист СФРЈ, 70/1987). У раду је као полазни алкохолни медијум за производњу екстракта коришћен житни алкохол (96%) купљен у локалном супермаркету. За производњу

екстракта биља и траварица коришћено је осушено биље Института за проучавање лековитог биља Јосип Панчић у Београду. Екстракт се састојао од мешавине биљног материјала који је садржавао 39 врста лековитог и ароматичног биља, 4 врсте сушеног воћа и коре храста.

Кандидаткиња је за производњу јаких алкохолних пића произведених са додатком гљиве *Ganoderma lucidum* користила уситњене делове гљиве, експериментално произведене екстракте и делимично пречишћен екстракт пакован у капсуле произвођача Алпхау, Фуџиан, Кина.

Уситњена сува плодносна тела гљиве коришћена су за добијање сирових алкохолних екстраката, а као екстракционо средство је коришћен 60% v/v и 70% v/v житни алкохол. У истраживању је направљено 6 екстраката, у којима је испитиван утицај времена екстракције (24 h, 15 дана и 30 дана), величине честица (сецкани и млевени узорци гљиве) и температуре (собна и 40°C) на квалитативне и квантитативне карактеристике екстраката.

Екстракти су произведени према следећим варијантама:

**E1** – 40 g/L сецкане гљиве је екстраховано током 15 дана на собној температури и тамном месту; **E2** – 40 g/L млевене гљиве је екстраховано током 15 дана на собној температури и тамном месту; **E3** – 40 g/L сецкане гљиве је екстраховано током 30 дана на собној температури и тамном месту; **E4** – 40 g/L млевене гљиве је екстраховано током 30 дана на собној температури и тамном месту; **E5** – 40 g/L уситњене гљиве је екстраховано током 24 h на 40°C у тамној боци; **E6** – 40 g/L млевене гљиве је екстраховано током 24 h на 40°C у тамној боци.

Екстракција је вршена у боцама запремине 1 L, које су током екстракције биле мешане константно на тресилици. Након завршене екстракције извршена је филтрација узорака, који су затим упаравани на вакуум упаривачу до 1/5 масе. Добијени екстракт складиштен је у боце које су чуване на 4°C до анализе. За сваки узорак поступак је поновљен 3 пута.

Екстракција састојака гљиве обављена је у алкохолним медијумима са садржајем етанола 45% v/v у стакленим посудама на собној температури. Екстракција је вршена током: 7, 15, 21, 30, 45 и 60 дана са количином сецканог плодносног тела гљиве са 0.2%, 1%, 2.5% и 4% константним мешањем на магнетној мешалици. Сви узорци су филтрирани и складиштени у зелене боце на тамном на собној температури (16 – 20°C) до анализе. Сви узорци су урађени у трипликату.

Екстракцијом једињења гљиве у алкохолним медијумима, долази до промена хемијског састав алкохолних медијума. Кандидаткиња је користила методу по Folin-Ciocalteu (Singelton и Rosi, 1965) да би одредила промену садржаја укупних фенола у узорцима екстракта и пића са додатком гљиве *G.lucidum*, а резултати су изражени у mg/L галне киселине. Антиоксидативни потенцијал одређиван је FRAP (Benzie и Strain, 1996) и TEAC (ABTS) (Re et al., 1999) тестом и DPPH методом (Brand-Williams et al., 1995). Поређењем добијених резултата испитивана је корелација садржаја укупних полифенола и антиоксидативног капацитета пића.

За анализу боје узорака кандидаткиња је користила следеће методе: АОАС методу 992.09 (АОАС, 1998) за одређивање боје дестилисаних пића и CIELab методу, код које је боја анализирана коришћењем колориметра Chromometer model CR410 са

извором светлости D<sub>65</sub>. Резултати су изражени у CIE (Интернационална комисија за оцењивање) параметрима: L\*, a\* и b\*, према color space методи.

За одређивање β-гљукана коришћен је Мегазим ензимски кит (Megazyme, Irska). Лиофилизован узорак је био подвргнут киселој хидролизи са conc. HCl, а затим третиран са 2 M KOH. После центрифугирања, од супернатанта узиман је аликуот коме се додавала мешавина егзо-β-(1→3)-Д-гљуканазе и β-гљукозидазе. За одређивање садржаја укупних гљукана додавана је гљukoза оксидаза/пероксидаза реагенс. Абсорбанца раствора анализирана је спектрофотометријски на λ=510 nm. За одређивање садржаја α-гљукана додавана је амилогљукозидаза. Абсорбанце раствора анализирани су спектрофотометријски на λ=510 nm. Садржај β-гљукана одређен је као разлика укупних и α-гљукана. Прерачунавање је извршено коришћењем Мегазимовог програма Mega-Calс™. Растворљиви шећери су идентификовани и квантификовани методом течне хроматографије под великим притиском (HPLC–PAD). Концентрације гљukoзе, фруктозе и сахарозе у узорцима су прерачунате на основу величине њихових пикова, при чему су као стандарди коришћене чисте супстанце (Sigma Co. St. Louis, MO).

За идентификацију и одређивање количине тритерпенских киселина у лиофилованим узорцима екстраката и јаких алкохолних пића произведених са додатком гљиве *Ganoderma lucidum* коришћен је HPLC-DAD/ESI-MS-MS експеримент извођен на Waters TQ (Tandem Quadrupole) инструменту спојеним са Water Acquity UPLC H-Class HPLC системом. Наведени HPLC-DAD/ESI-MS-MS експеримент у режиму скенирања је коришћен за процену количине компоненти. Количина једињења је одређена поређењем површине пикова добијених за одређене компоненте са површине пика добијених за интерни стандард (холна киселина).

Садржај фенолних компоненти у узорцима је одређен помоћу HPLC уређаја Agilent 1100 (USA) опремљеног са UV/DAD детектором. Хроматографска сепарација је извршена на колони Porosxell 120 EC-C18 (4.6x100mm 2.7 μm). Систем растварача имао је константну брзину протока 1.0 ml/min. Мобилна фаза А сачињавала је дестилована вода са 0.1% глацијалне сирћетне киселине, а мобилну фазу Б ацетонитрил са 0.1% глацијалне сирћетне киселине. Таласне дужине за детекцију су изабране према апсорционом максимуму анализираних фенолних компоненти и укључују 225 nm (ванилинска киселина, бензоева киселина), 280 nm (гална киселина, 4-хидроксibenзоева киселина, катехин, сиригинска киселина, транс-цинаминска киселина, хесператин, нарингенин), 305 nm (кумаринска киселина, ресвератол), 330 nm (хлорогенска киселина, кафа киселина) и 360 nm (рутин, кверцетин, камферол). Квантитативна анализа урађена је коришћењем екстерне стандардне методе. Стандардни основни раствор (1, 2.5, 5, 10, 15, 25 mg/L) је направљен са диметилсулфоксидом (DMSO). Све стандарне калибрациона криве су имале висок степен линеарности ( $r^2 > 0.99$ ).

Ароматски комплекси узорака анализирани су на апарату Agilent 7890A са MS-детектором Agilent 5975C. Убризгавано је по 1 μl сваке пробе (сплит 25:1). Коришћена је колона Agilent 19091N- 30 m x 320 μm x 0.25 μm са поларном течном фазом HP-INNOWax (полиетилен-гликол). Проток гаса је био 50.4 ml/min, а као носећи гас коришћен је хелијум. Температура инјектора је износила 220 °C. Почетна

температуре колоне је износила 40°C, а затим расла 3°C/min до 230°C. Као детектори су коришћени истовремено FID и MSD.

Анализирана су антимикуробна својства екстракта *Ganoderma lucidum*, екстракта биља и јаких пића обогачених екстрактима гљиве *G. lucidum* и биља *in vivo* методом дифузије са филтер дискова. Анализа је обављена према препорукама Nacional Commitee for Clinical Labaratory Standards (NCCLS, 2007). Испитивање је вршено на следећим врстама патогених микроорганизама: *Salmonella enteritidis* ATCC 31806, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Сензорна анализа је обављена комисијски коришћењем модификованог Вихбаум-овог модела позитивног рангирања са максимумом 20 бодова. Оцењивана су следећа сензорна својства: боја, бистрина, типичност, мирис и укусу.

Антипролиферативни потенцијал испитиваног комплекса обогаченог једињењима гљиве *Ganoderma lucidum* и лековитог биља, утврђен је колориметријским МТТ тестом (Supino et al., 1995). Коришћене су следеће 4 ћелијске линије, које укључују туморске ћелије: ћелије хуманог карцинома грлића материце (HeLa), ћелије хуманог меланома (FemX), ћелије аденокарцинома плућа (A549) и трансформисане ендотелијалне линије хуманог (EA.hy 926). У научном циљу наведено је да ће се за испитивање функционалних својстава комплекса обогаченог полифенолним материјама гљива користити Б и Т ћелијске линије. Због финансијских тешкоћа није било могућности да се купе наведене ћелијске линије или наведено истраживање обави у некој иностраној институцији. У раду су зато коришћене већ постојеће ћелијске линије колекције ћелијских линија Института за онкологију и радиологију Србије.

За обраду и интерпретацију добијених експерименталних података, различитим методима статистичке анализе, коришћен је статистички програм MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional).

Пето поглавље **Резултати и дискусија** представља најважнији део докторске дисертације и састоји се од 7 потпоглавља: *Анализа хемијског састава гљиве Ganoderma lucidum; Анализа хемијског састава алкохолних медија; Анализа етанолних екстракта Ganoderma lucidum; Пића обогачена гљивом Ganoderma lucidum; Специјалне траварице са G. lucidum; Антимикуробно дејство екстракта и специјалних ракија са додатком G. lucidum поступак испитивања антипролиферативног потенцијала комплекса обогаченог G. lucidum.* У овом поглављу изнети су резултати истраживања и њихово поређење са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици.

У **потпоглављу 5.1.** кандидаткиња приказује резултате анализе хемијског састава гљиве *Ganoderma lucidum* и наводи да је садржај воде износио 10.39 %, суве материје 89.61%, садржај протеина 10.33 g/100g, масти 1.13 g/100g, угљених хидрата 68.10 g/100g и пепела 0.86 g/100g.

За производњу екстракта и пића коришћена је млевена гљива *Ganoderma lucidum*, којој је одређен средњи пречник (d) на сету сита различитих промера и износио је 0.130 mm. За производњу екстракта гљиве коришћени су и узорци уситњене гљиве димензија око 1 cm.

У потпоглављу 5.2. представљени су резултати квалитативне анализе хемијског састава коришћених алкохолних медијума житног алкохола, шљивове препеченице, лозове препеченице и винског дестилата. Добијени резултати су табеларно приказани и у сагласности са Правилником о категоријама, квалитету и декларисању ракија и других алкохолних пића, „Службени гласник РС“, број 73/10.

Поред хемијског састава коришћених медијума, због важности за квалитет производа, анализиран је и ароматски састав коришћених алкохолних медијума помоћу GC-MS анализе, а резултати су табеларно приказани. Гаснохроматографском анализом житног алкохола је утврђено да ароматски комплекс чине 12 једињења, шљивове препеченице 40 једињења, у саставу ароматског комплекса винског дестилата детектовано је 20 једињења, а лозоваче 37 једињења. Детектована једињења припадала су у групи виших алкохола, карбонилних једињења, естра, алдехиде, кетона, органских киселина, фенолних једињења, терпенских алкохола и угљоводоничних једињења.

У потпоглављу 5.3. кандидаткиња је представила резултате анализе утицаја екстракционих параметара (времена екстракције и величине честица) на хемијски састав етанолних екстракта гљиве *Ganoderma lucidum*, ради утврђивања оптималних услова за њихову производњу. У екстрактима је анализиран садржај шећера,  $\beta$ -гљукана, укупних полифенола и антиоксидативни капацитет, квалитативно и квантитативно је одређен садржај фенолних једињења и тритерпенских киселина и анализа боје датих узорака.

Резултати HPLC анализе садржаја шећера показују да садржај сахарозе и фруктозе у узорцима је мањи од 0.5 g/L. Узорци за чију производњу је коришћена сецкана гљива која је екстрахована током 15 и 30 дана, садржали су 0.7 g/L глукозе, а узорак естрахован током 24 h садржао је мање од 0.5 g/L глукозе.

Анализом садржаја укупних гљукана,  $\alpha$ -гљукана и  $\beta$ -гљукана екстраката *Ganoderma lucidum*, установљено је да узорци екстраката направљени додавањем сецкане гљиве садржали су незнатно већу количину укупних и  $\beta$ -гљукана у односу на узорке направљене од млевене гљиве. Највећи садржај укупних и  $\beta$ -гљукана имао је узорак сецкане гљиве који је екстрахован током 15 дана и садржао је 18.55 g/100g и 15.64 g/100g, респективно. Узорци добијени екстракцијом *G. lucidum* током 24 h имали су најмању количине ових гљукана. Запажа се да време екстракције има велики утицај на садржај гљукана, и са повећањем времена екстракције њихова количине се повећава, али до извесне границе, након које долази до смањења њиховог садржаја.

Садржај полифенола анализираних екстраката износио од 406.82 до 658.48 mg/L. У експерименту је коришћен и полупречишћени екстракт, који је растворен у 45% етанолу. Додатком екстракта долази до појаве замућења алкохолних медијума, па је након декантације узорка одређен садржај укупних полифенола, који је износио 22.4 mg/L GAE. Резултати антиоксидативног капацитета анализираних узорака екстраката одређивани су DPPH, FRAP и TEAC методом и табеларно су приказани. Резултати DPPH анализе се налазе у интервалу између 1.4-3.07 mM TE, а TEAC анализе 2.51-5.95 mM TE. На основу резултата статичке анализе запажено је да на антиоксидативни капацитет одређен DPPH и TEAC методом величина честица гљиве, нема статистички значајан утицај. Код узорака екстраката направљених од



сецкане гљиве, временом се антиоксидативност повећава, тако да након 24 h екстракција компоненти које утичу на антиоксидативност није завршена.

У узорцима етанолних екстраката HPLC методом детектоване су следеће полифенолне компоненте: гална киселина, хлорогена, кверцетин, транс-циметна киселина, камферол, хесперетин и нарингенин. Величина честица има интрузивнији ефекат на количину екстрахових једињења, него на њихову композицију. Садржај укупних фенола одређен HPLC анализом за узорке направљене од 40 g/L сецкане и млевене гљиве екстраховане током 30 дана, износио је 2.432 mg/L и 3.542 mg/L, респективно. На основу резултата може се закључити да величина честица има важан утицај на садржај фенола, да је екстракција комплетнија код узорка млевене гљиве.

Резултати HPLC-DAD/ESI-ToF-MS анализе екстракта гљиве су табеларно приказани. На основу њих може се закључити да екстракциони параметри нису утицали на композицију тритерпенских киселина, већ само на њихов квантитативни садржај. У екстрактима је идентификовано 15 тритерпенских киселина: ганодеринске киселине (A, B, C2, C6, D, F, G, J), ганодеренске киселине (D), луциденске киселине (A, E, D2, LM1), 12-хидрокси-ганодеринска киселина D и елфингениска киселина A. Садржај укупних анализираних тритерпенских киселина приказан је графички, као и садржај горких тритерпенских киселина. Најефикаснија је екстракција узорка код кога је коришћена сецкана гљива екстрахована током 15 дана. Сецкана *G. lucidum* се показала као ефикаснија сировина за производњу екстраката, тако да се даље користила као сировина за производњу јаких алкохолних пића.

Боја етанолних екстраката је анализирана CIElab методом а резултати су приказани помоћу слике. Резултати показују да L\* вредност, која дефинише светлину производа, се смањује са повећањем екстрахованих компоненти из гљиве. Код узорка екстраката сецкане и млевене гљиве, време екстракције није имало ефекта на светлину узорка екстраката. Сви анализирани узорци имали су одређени удео црвене боје, с обзиром на вредности a\* параметра. На основу анализираних вредности за параметар b\*, сви анализирани узорци екстраката имали су одређени удео жуте боје, који се код узорка са истим временом екстракције незнатно мењао.

У **поглављу 5.4.** кандидаткиња је представила резултате испитивања могућности производње специјалних ракија са додатком гљиве *Ganoderma lucidum* и утицај следећих фактора: времена екстракције (7, 21 и 60 дана), врсте алкохолног медијума (шљивове препеченице, лозове препеченице, житног алкохола и винског дестилата) и концентрације гљиве (1, 2.5% и 4%). На основу прелиминарних резултата установљено је да додатком гљиве у концентрацији 0.2% није имао значајан утицај на хемијски састав јаких алкохолних пића, а значајне промене нису имале ни екстракције у временском периоду 15, 30 и 45 дана.

За производњу специјалних ракија коришћена је сецкана *Ganoderma lucidum*. Сензорном анализом узорка млевене и сецкана гљиве утврђено је да узорци којима је додавана млевена гљива имају непријатну накнадну горчину, и сматра се да је због ситнијих честица, екстракција горких материја интензивнија.

Код свих узорка специјалних ракија и винских дестилата садржај укупних фенола се пропорционално повећавао са повећањем концентрације додате гљиве. Време екстракције за узорке са истом концентрацијом додате гљиве имало је различит утицај на садржај укупних фенола и антиоксидативни капацитет у односу

на коришћени медијум. Кандидаткиња је установила да се оптимално време екстракције за исте концентрације разликовало у односу на примењени медијум.

Анализом корелације између резултата анализе садржаја укупних фенола (TPC) и антиоксидативног капацитета одређеног FRAP, DPPH и TEAC методама узорака специјалних ракија и винских дестилата, утврђена је висока корелација између ових узорака ( $r_{\text{TPC-FRAP}}=0.9702$ ,  $r_{\text{TPC-DPPH}}=0.9618$ ,  $r_{\text{TPC-TEAC}}=0.9462$ ). Може се закључити да садржај укупних полифенола има важан утицај на антиоксидативни капацитет узорака.

Етанолном екстракцијом компонената гљиве *Ganoderma lucidum* долази до промене боје безбојних алкохолних медијума лозове препеченице, шљивове препеченице, житног алкохола и винског дестилата. Према резултатима АОАС метода, може се закључити да са повећањем концентрације додате гљиве у узорцима се повећава и интензитет боје код свих алкохолних медијума. Испитивањем међусобне повезаности између резултата интензитета боје, садржаја укупних фенола и антиоксидативности узорака специјалних ракија и винских дестилата утврђен је висок степен корелације. Висок степен корелације ( $r^2=0.9618$ ) између садржаја укупних полифенола и интензитета боје указује да су фенолне материје важна једињења која утичу на интензитет боје и да са повећањем садржаја укупних фенола се повећава интензитет боје узорака.

Резултати боје шљивове и лозове препеченице, житног алкохола и винског дестилата са додатком гљиве *Ganoderma lucidum* анализираних СIElab методом, приказани су помоћу слика. Дате су и фотографије наведених узорака на којима се уочава промена боје узорака услед различитих параметара екстракције у њиховој производњи. На основу анализираних резултата може се закључити да са повећањем концентрације додате гљиве код свих алкохолних медијума долази до смањења светлине узорака, а повећава се интензитет црвене и жуте боје. Време екстракције има различит ефекат код истих концентрација у зависности од коришћеног медијума.

Кандидаткиња је користила етанолне екстракте гљиве *Ganoderma lucidum* да би убрзала и стандардизовала поступак производње јаких алкохолних пића. Уједно је упоређивала ефекат етанолних екстраката на интензитет боје алкохолних медијума са мацератима ове гљиве. Екстракти су додавани у различитим процентима од 2% до 50%, а резултати су приказани помоћу фигуре. Установљено је да би у се додатком екстракта постигао интензитет боје као мацерацијом 1% гљиве током 7 дана у житном алкохолу, неопходно је додати 10 - 15% у зависности од коришћеног екстракта гљиве. Додатком већих количина екстракта интензитет боје се повећава код испитиваних узорака. Дозирање је веома велико и ефекасније је коришћење непрерађене гљиве.

HPLC-DAD/ESI-ToF-MS анализом састава и садржаја тритерпенских киселина узорака житног алкохола са додатком *G.lucidum* установљено је да утицај времена екстракције и концентрације гљиве има утицај само на њихов квантитативни садржај. Анализом састава тритерпенских киселина у узорцима житних алкохола са *G. lucidum* идентификована су следећа једињења: ганодеринске киселине (А, В, С2, С6, D, F, G, и J), ганодеринске киселине (D), луциденинска киселина (А, Е, D2, и LM1), 12-хидрокси-ганодеринске киселине и елфингенска киселина А. Квантитативном анализом узорака специјалних житних ракија утврђено је да је најзаступљенија

ганодеринска киселина А, чији је садржај у зависности од услова екстракције био од 0.528% до 0.781%.

На основу резултата истраживања ароматског комплекса јаких алкохолних пића са додатком гљиве, закључило се да екстраховањем једињења гљиве долази до већих промена у концентрацији већ постојећих компонената алкохолних медијума, него у њиховом саставу. Упоредивани су узорци са истом количином гљиве, да би се упоредила интеракција хемијских једињења различитих алкохолних медијума са једињењима гљиве. У свим узорцима јаких пића са додатом гљивом детектован је алкохол хексанол, кога је у почетним медијуму садржала само лозова препеченица. У узорку лозове препеченице концентрација хексанола је повећана. Изоамил ацетат није детектован код алкохолних пића са гљивом, иако су га сви полазни медијуми садржали. Садржај киселина се повећавао код свих узорака, а додатком гљиве долазило је и до промена у квалитативном саставу киселина у испитиваним узорцима. Услед реакције киселина и алкохола у испитиваним медијумима образовали су се естри, који обогаћују арому пића. Иако се код лозове препеченице након додатка гљиве, концентрација изоамил алкохола смањивала након додатка гљиве, ово једињење је најдоминантније у свим узорцима специјалних ракија. У алкохолно воденој смеси одиграва се велики број реакција, међу којима је настанак ацетала 1.1-диетокси етана у реакцији ацеталдехида са етанолом, тако да се у свим анализираним узорцима садржај датог ацетала повећава и редукује се опор мирис. Фурфурал се детектује у свим узорцима са додатом гљивом, а у алкохолним медијумима у којима је детектован долази до повећања концентрације. У узорцима специјалних ракија детектована су једињења еугенол и фурфурал, који спадају у карактеристичне кватернерне материје детектоване у јаким пићима након сазревања у дрвеним бурадима.

Кандидаткиња у приказу и дискусији резултата сензорне анализе специјалних ракија и винског дестилата са додатком гљиве *Ganoderma lucidum* константује да је коначна сензорна оцена анализираних узорака била између 16.20 и 18.26, што је веома добар резултат. Најбоље су били оцењени узорци за чију је производњу коришћен вински дестилат као алкохолна основа.

У **потпоглављу 5.5.** кандидаткиња је приказала резултате испитивања утицаја биљне мешавине на садржај полифенола и антиоксидатвни капацитет, ароматски комплекс и сензорне карактеристике специјалних ракија са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*. Установљено је да додатком екстракта биља специјалним ракијама са *G.lucidum* статистички значајно се повећао садржај укупних полифенола у свим анализираним узорцима, који је износи 160-223 mg/L GAE.

Установљено је да код узорака специјалних траварица, за чију су производњу као алкохолна основа коришћени житни алкохол, лозова и шљивова препеченица, са повећањем времена екстракције гљиве повећава се и садржај укупних фенола. Изузетак су узорци винског дестилата код којих са повећањем времена екстракције долази до смањења садржаја укупних фенола. Антиоксидативни капацитет узорака специјалних траварица направљених коришћењем гљиве *Ganoderma lucidum* одређиван је помоћу DPPH и FRAP метода, и за дате узорке имао је вредност у интервалу 1.22-1.53 FRAP јединица и 0.44-0.85 mmol TE, респективно. Додатком екстракта биља код свих анализираних узорака долази до статистички значајног

повећања антиоксидативног капацитета, иако су додате исте количине биља ефекат није имао сразмеран утицај на АО свих узорака.

Анализом корелације између резултата садржаја укупних полифенола (TPC) и антиоксидативног капацитета одређеног FRAP и DPPH методом узорака специјалних ракија са екстрактима биља утврђена је висока корелација између ових узорака ( $r_{\text{TPC-DPPH}}=0.833$ ,  $r_{\text{FRAP-DPPH}}=0.734$ ). Стога се закључује да је садржај укупних полифенола имао важан утицај на антиоксидативни капацитет одређиван методом DPPH, док је садржај укупних полифенола имао мање значајан утицај на резултате АО одређиване FRAP методом.

GC-MS анализом ароматског састава траварица са гљивом *G. lucidum* детектована су следећа једињења која специјалне ракије нису садржавале: деканол, анетрон, етил-тетрадеканоат, етил-стеарат, хексанал, терпинен-4-ол, неоментол, спатуленол, ванилин, олеинска киселина и линолна киселина.

Кандидаткиња у приказу и дискусији резултата сензорне анализе ракија за чију је производњу коришћена гљиве *G. lucidum* (40 g/L) екстрахована у различитим временским периодима, констатује да су сензорне оцене анализираних узорка износиле од 16.85 до 18.55, што је веома добар резултат, на основу кога се може недвосмислено закључити да ароматичне материје биља сензорно обогаћују и оплемењују узорке специјалних ракија. Најбоље оцењени узорак био је онај за чију је производњу коришћена лозова ракија а гљива екстрахована током 21 дана.

У **потпоглављу 5.6.** кандидаткиња даје приказ резултата антимикуробног дејства селектованих узорка екстракта *G. lucidum*, специјалних ракија са *G. lucidum*, специјалних траварица са додатком гљиве *G. lucidum* и екстракта биља на стандарне сојеве микроорганизама *Salmonella enteritidis* ATCC 31806, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Етанолни екстракт *G. lucidum* (Е3) инхибиторно је деловао на G + бактерије *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, а стимулативно дејство је имао на раст G (-) бактерија *Salmonella enteritidis* ATCC 31806 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032. Резултати антимикуробног дејства узорка етанолног екстракта су у сагласности са ранијим истраживањима који су показала да су полифеноли главни носиоци антимикуробног дејства екстраката гљива. На основу резултата антимикуробне активности испитиваних узорака, закључује се да је узорак траварица са гљивом *G. lucidum* имао најефикасније антимикуробно дејство на испитиване микроорганизме.

У **потпоглављу 5.7.** кандидаткиња приказује резултате испитивања антипролиферативног потенцијала комплекса обогаћеног *G. lucidum* на ћелијске хуманог карцинома грлића материце (HeLa). Након третмана од 24 h IC<sub>50</sub> вредности за испитиване узорке износиле су 364.8 µg/ml (Е2), 394.3 µg/ml (Е6) и 212.7 µg/ml (Т3), а након 48 h 244.3, 335.5 и 123.8 µg/ml, респективно. На основу разматрања добијених резултата кандидаткиња недвосмислено закључује да узорци Е2 и Т3 имају временски и дозно зависно деловање, док је дејство узорка Е6 само дозно зависно. Најефикасније антипролиферативно дејство на HeLa ћелије показивао је узорак Т3. Антипролиферативни ефекат лиофилизованог узорка шљивове ракије обогаћеног једињењима гљиве *G. lucidum* и мешавине биља (Т3) испитиван је на ћелије хуманог карцинома грлића материце (HeLa), ћелије хуманог меланома

(FemX), ћелије аденокарцинома плућа (A549) и трансформисане ендотелијалне линије хуманог (EA.hy 926). На основу добијених резултата закључено је да је дејство узорка дозно и временски зависно. Са повећањем периода деловања IC<sub>50</sub> вредност се смањује, па је стога установљено да је потребна мања количина узорка за постизање истог ефекта. На основу IC<sub>50</sub> вредности рангирано је дејство узорка ТЗ на ћелијске линије: HeLa >FemX>EA.hy 926>A549.

У шестом поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније чињенице до којих је дошла на основу својих истраживања.

Додатком гљиве *Ganoderma lucidum* алкохолним медијумима статистички се значајно повећао садржај фенола у свим узорцима у односу на полазне медијуме. Са повећањем концентрације додате гљиве, повећао се и садржај полифенола. Оптимално време екстракције за исте концентрације додате гљиве зависило је од примењеног медијума.

Кандидаткиња указује да је време екстракције при производњи етанолних екстраката пропорционално величини честица. Садржај горких тритерпенских киселина се са повећањем времена екстракције значајно смањује код узорака екстраката произведених од сецкане гљиве, па се горчина код анализираних узорака смањује. Закључено је да је недвосмислено сецкана *G. lucidum* ефикаснија сировина за производњу екстраката.

Селектовани узорци имали су антимикубно дејство, али кандидаткиња указује на чињеницу, да је њихова ефикасност била пропорционална садржају укупних полифенолних једињења.

Кандидаткиња на основу резултата испитивања антипролиферативног ефекта лиофилизованих узорака екстракта гљиве и шљивове ракије обогаћене једињењима гљиве *G. lucidum* и мешавине биља на ћелије хуманог карцинома грлића материце (HeLa) закључује да узорци лиофилизата недвосмислено имају антипролиферативни ефекат на HeLa ћелијске линије. Антипролиферативни ефекат јасно се показао код лиофилизованог узорка шљивове ракије обогаћен једињењима гљиве *G. lucidum* и мешавине биља, на ћелије хуманог карцинома грлића материце (HeLa), ћелије хуманог меланома (FemX), ћелије аденокарцинома плућа (A549) и трансформисане ендотелијалне линије хуманог (EA.hy 926). На основу добијених резултата може се закључити да је дејство узорка дозно и временски зависно.

На основу резултата кандидаткиња закључује да лиофилизовани узорци недвосмислено показују антимикубно и антипролиферативно дејство услед екстракције биолошки активних једињења гљиве *G. lucidum*.

На основу приказаних резултата анализе садржаја укупних фенола, антиоксидативних карактеристика и сензорних карактеристика, закључено је да се екстрактибилна једињења гљиве најбоље уклапају у хемијски комплекс винског дестилата, при чему се повећала и функционална карактеристика пића, а уједно оплемениле и њене сензорне карактеристике.

На основу резултата анализе садржаја укупних и β-глюкана, кандидаткиња закључује да величина честица коришћених за производњу екстракта није имала значајан утицај на њихов садржај, али време екстракције јесте. Стога са повећањем

времена екстракције њихова количине се повећавала до извесне границе, након које је долазило до смањења њихове количине.

Производњом специјалних пића са гљивом *Ganoderma lucidum* долази до квалитативних и квантитативних промена у ароматском и хемијском комплексу током поступка сазревања. Екстахована једињења гљиве имају већи утицај на концентрацију компоненти које чине ароматски комплекс пића у односу на квалитативни састав. Установљено је да коришћена алкохолна основа у многеме дефинише ароматски састав узорака специјалних ракија и траварица са додатком гљиве *Ganoderma lucidum*.

Кандидаткиња закључује на основу анализе интензитета боје да етанолни екстракти могу бити интересантна замена карамелу, који се данас користи за стандардизацију боје јаких алкохолних пића. На основу датих резултата, недвосмислено се закључује да начин производње екстракта има важан утицај на ефикасност етанолних екстраката.

На основу приказа, анализа и одговарајуће дискусије експериментално добијених резултата, кандидаткиња јасно и недвосмислено закључује да је *Ganoderma lucidum* интересантна сировина за производњу јаких алкохолних пића. Додатком ове гљиве добијају се сензорно прихватљива пића са побољшаним функционалним карактеристикама. Кандидатакиња посебно истиче чињеницу да је вински дестилат најпогоднија алкохолна основа, јер су се екстрактивна једињења гљиве најбоље уклапала у његов хемијски комплекс и оплемењивала његове сензорне карактеристике.

У седмом поглављу **Литература** кандидаткиња наводи **202 референце** које су у докторској дисертацији коришћене кроз критичке осврте и поређења у оквиру прегледа, анализе и дискусије резултата истраживања. Референце су написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење.

### 3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу прегледа и анализе докторске дисертације под насловом „**УТИЦАЈ ПЛОДНОСНОГ ТЕЛА ГЉИВЕ *Ganoderma lucidum* НА ХЕМИЈСКИ САСТАВ И СЕНЗОРНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ СПЕЦИЈАЛНИХ РАКИЈА**“ коју је поднела Соња Печић, као и поређењем прихваћеног и оствареног програма истраживања, Комисија пре свега констатује да су успешно обављена сва предвиђена истраживања и да је дисертација самосталан и оригиналан научни рад, а резултати и дискусија су представљени на високом нивоу. Током експерименталног рада, као и током анализе података и писања саме дисертације, кандидаткиња је показала зрелост, самосталност и умешност која карактерише сазрелог научника и професионалца у својој области. Велики број резултата истраживања је одговарајуће обрађен и добро приказан, углавном у оквиру великог броја табела које логично прате текст. Анализа и коментари резултата су јасни и прецизни, док посебан квалитет чине бројни подаци других аутора који су вешто коришћени и добро уклопљени у целину рада, као и

примена аутоцитата, тако да се, без обзира на обимност која је проистекла из обимног програма дисертације, текст веома лако прати и усваја.

Резултати истраживања остварени у оквиру ове докторске дисертације су веома значајни, како за науку, тако и за праксу, јер доприносе даљој карактеризацији и афирмацији јаких алкохолног пића, за чију се производњу користи гљива *Ganoderma lucidum*.

Имајући у виду све наведене констатације, Комисија позитивно оцењује урађену докторску дисертацију Соње Печић под насловом „УТИЦАЈ ПЛОДНОСНОГ ТЕЛА ГЉИВЕ *Ganoderma lucidum* НА ХЕМИЈСКИ САСТАВ И СЕНЗОРНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ СПЕЦИЈАЛНИХ РАКИЈА“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, да **прихвати ову позитивну оцену, чиме би се пружила могућност кандидаткињи да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације**

У Београду, 27.02.2015

#### Чланови комисије:

---

др Нинослав Никићевић, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду  
Ужа научна област: Технологија врења

---

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

---

др Ида Лескошек Чукаловић, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду  
Ужа научна област: Технологија врења

---

др Предраг Вукосављевић, ванредни професор  
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду  
Ужа научна област: Технологија конзервисања

---

др Веле Тешевић, ванредни професор  
Хемијски факултет, Универзитет у Београду  
Ужа научна област: Органска хемија

## ПРИЛОГ

Радови кандидаткиње Соње Пецић објављени у часописима који се налазе на SCI листи:

1. **С. Пецић**, М. Вељовић, С. Деспотовић, И. Лескошек-Чукаловић, М. Јадранин, В. Тешевић, М. Никшић, Н. Никићевић (2012): „Effect of maturation conditions on sensory and antioxidant properties of old Serbian plum brandies”, *European Food Research and Technology*, 235, 479-487.