

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Наставно-научног Већа Фармацеутског факултета, одржаној 26.12.2019. године, именована је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Полифенолни састав и антиоксидативна својства воћних вина и њихов утицај на ензимске системе *in vitro***“, кандидата дипломираног фармацеута Уроша Чакара, студента докторских студија на Катедри за броматологију Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, у следећем саставу:

1. Dr sc. Брижита Ђорђевић, ментор, редовни професор, Катедра за броматологију, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет,
2. Dr sc. Александар Петровић, ментор, доцент, Катедра за технологију конзервисања и врења, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. Dr sc. Иван Станковић, редовни професор, Катедра за броматологију, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет.

Чланови Комисије су прегледали приложену дисертацију и подносе Наставно научно Већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. САДРЖАЈ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација је написана на 141 страни, има 55 табела, 41 слику и 356 литературних навода. Садржај докторске дисертације изложен је у следећим поглављима: Увод (2 стране), Општи део (18 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материја и методе (16 страна), Резултати и дискусија (85 страна), Закључци (2 стране) и Литература. Табеле су добро укомпоноване, веома су прегледне и јасне, док су графици и дијаграми добро урађени и прате текст.

Поглавље **Увод** даје кратак историјат производње вина од грозђа и других врсти воћа. Такође, истакнуто је да се вино може производити и од било ког другог воћа и то према поступцима који се много не разликују од оних за производњу вина од грозђа. Наведено је да се сваке године повећава количина произведеног воћа у свету. У светским статистикама Организације Уједињених нација за храну и пољопривреду (FAO) Србија је један од водећих европских, али и светских произвођача малине, купине и шљиве. Поред производње воћа поменуто је тренутна ситуација везана за производњу воћних вина, где је истакнут сидер или вино од јабуке. Европа је континент који учествује у 70% светске производње воћних вина, али и предњачи у потрошњи истих.

Поглавље **Општи део** даје приказ о нутритивном саставу воћних вина, биолошки активним једињењима и њиховом утицају на људски организам. Дат је

приказ делова света у којима се данас производе воћна вина и колики су интервали за садржај алкохола. Објашњен је и значај квалитета воћа као сировине за производњу вина. У оквиру поглавља су приказана најзначајнија полифенолна једињења која се по свом садржају истичу у воћним винима попут фенолних киселина и флавоноида. Представљени су и најзначајнији путеви биосинтезе фенолних киселина и полифенола сложеније структуре. У оквиру овога дела истакнути су ензими антиоксидативне заштите супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и каталаза. Такође је, посебна пажња посвећена и малон-диалдехиду, као чиниоцу који указује на оксидативно оштећење ћелијске мембране услед липидне пероксидације. На крају поглавља представљен је утицај биолошки активних једињења из воћних вина у заштити од слободних радикала и превенцији хроничних незаразних болести.

Циљеви истраживања су јасно и прецизно постављени. Први циљ је био производња вина од аутохтоних врста воћа, уз спровођење поступка контролисаних микровинификације и утврђивање утицаја два соја квасца рода *Saccharomyces cerevisiae* на полифенолни састав воћних вина. Други циљ је био да се спроведу огледи са и без додатка ензимског препарата гликозидаза (ЕПГ - Enartis Zym, Enartis, Italy) са и без додатка шећера у воћни кљуку пре почетка врења. На основу претходно реченог дефинисан је главни циљ, груписање воћних вина на основу садржаја најзаступљенијих полифенолних једињења. Такође су постављени циљеви да се утврди утицај лиофилизата воћних вина произведених различитим енолошким третманима на инхибицију ензима α -глукозидазе, као и у изолованим синаптозомима на активност ензима антиоксидативне заштите и степена липидне пероксидације.

Поглавље **Материјал и методе** аналогно постављеним циљевима, описује методе које је кандидат применио. У циљу остваривања постављених задатака ове дисертације, а на основу многобројних литературних података које је кандидат користио урађено је: одређивање полифенолног састава, антиоксидативног капацитета новодобијених вина, спроведени су експерименти *in vitro* на инхибицију α -глукозидазе, на активност ензима антиоксидативне заштите и снижавање степена липидне пероксидације.

У одељку *Микровинификација* описан је поступак производње воћних вина. Воће од кога је произведено вино у свим спроведеним експериментима (1 и 2) било је фитосанитарно 100% здраво. Воћна вина су произведена на два начина. У оквиру експеримента 1 пре почетка алкохолног врења сво коштичаво воће (вишња, трешња, шљива, бресква и кајсија) прерађено је на два начина. Први је подразумевао присуство коштице у воћном кљуку, док је у другом врење спроведено без присуства коштице. Овакав начин производње је важио за коштичаво воће при чему се пазило да не дође до оштећења коштице и евентуалног издвајања бензалдехида који би се детектовао током анализе. У оквиру експеримента 1 произведена су вина и од бобичастог (аронија, боровница, малина и купина), јагодичастог (јагода) и јабучастог (јабука) воћа. Да би се инхибирао раст микрофлоре која може створити нежељене производе, воћни кљуку је у свим варијантама огледа сулфитисан са $K_2S_2O_5$ у концентрацији од 10g на 100kg кљука. У спроведеним истраживањима у добијени воћни кљуку је засејана чиста култура селекционисаног винског квасца *Lievito Secco* (Enartis, Italy) рода *S. cerevisiae* у количини 20 g/100 kg воћног кљука. На овај начин без шећера произведена је контрола. У оквиру експеримента 1 спроведени су огледи са и без додатка сахарозе на основу измереног природног садржаја шећера у кљуку изражених у степенима брикса ($^{\circ}$ Brix) изабраних врсти воћа. Садржај шећера у воћном кљуку је пре почетка алкохолног врења подешен на ниво тако да вино постигне око 12% v/v алкохола по завршетку врења кљука свих воћних врсти. Алкохолно врење је спроведено на температури 20°C током 10 дана уз два потапања дневно. По обављеном врењу, одвојен је самоток-младо

вино без примене притиска, даље су примењени поступци неге вина (претакање, доливање судова и сулфитисање). Након 6 месеци сазревања вина на подрумској температури (8 до 12°C) урађене су све анализе.

У оквиру експеримента 2 за производњу вина су коришћена следећа воћа: аронија, боровница, купина, малина, вишња и јабука. Све варијанте огледа подразумевале су дезинтеграцију воћа, сулфитисање добијеног кљука са 10g K₂S₂O₅ на 100kg воћа. Урађена је и корекција шећера за потенцијални ниво алкохола 12% v/v у крајњем производу. Прва подваријанта огледа подразумевала је додаток ензимског препарата гликозидаза - ЕПГ Enartis Zym (Enartis, Italy) у количини од 2 g на 100 kg воћног кљука, док у другом, у циљу поређења, ензим није додат. У циљу испитивања утицаја квасаца на полифенолни састав добијених вина употребљене су две чисте културе селекционисаног винског квасца Lievito Secco (Enartis, Italy) и ICV D254 (Lallemend, Canada) рода *S. cerevisiae* у количини од 20 g на 100 kg воћног кљука. Кошticaво воће у винификацији је прерађено као и у експерименту 1. Алкохолно врење и нега вина урађени су на исти начин као и у експерименту 1.

У одељку *Одређивање физичко-хемијских параметара воћних вина* описане су методе које су примењене у анализи добијених вина. Физичко хемијски параметри вина одређени су по прописаним методама важећим по Правилнику за анализу вина од грождја (Службени гласник Републике Србије, 87/2011 и 26/2015). У оквиру дела *Одређивање хемијског састава и биолошке активности воћних вина* детаљно су описане све методе за анализу воћних вина. Како би се утврдио полифенолни састав вина примењена је метода течне хроматографије ултравелике моћи раздвајања уз помоћ система UPLC-TQ-MS/MS. Антиоксидативни капацитет и садржај укупних полифенола воћних вина утврђени су FRAP, DPPH и методом по Folin–Ciocalteu (Benzie and Strain, 1996; Blois, 1958; Gorjanović et al., 2010; Worarathphoka et al., 2007). Урађено је одређивање анти α -глукозидазне активности узорака воћних вина (McCue et al., 2005). Молекуларни докинг примењен је за одређивање афинитета везивања изабраних полифенолних једињења за ензим α -глукозидазу. У оквиру дела *Параметри оксидативног стреса* описано је изоловање синаптозома из мозга пацова и третман синаптозома током експериментално изазваног оксидативног стреса. Такође, описане су и методе за одређивање активности ензима антиоксидативне заштите (супероксид дисмутазе, каталазе, глутатион пероксидазе), садржаја малон-диалдехида и концентрације протеина (Beutler, 1984; Wendel, 1980; Misra and Fridovich, 1972; Aruoma et al., 1989; Markwell et al., 1978). У делу *Статистичка обрада резултата* приказане су све методе које су примењене за обраду добијених резултата.

Поглавље **Резултати и дискусија** приказује оригиналне резултате добијене у оквиру ове докторске дисертације. Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације упоређени су са доступним литературним подацима.

Крајње поглавље дисертације истиче **Закључке** добијене на основу анализе резултата истраживања.

Поглавље **Литература** састоји се из литературних навода. У поглављу литература кандидат наводи 356 референце готово искључиво иностраних аутора. Највећи број литературних навода је новијег датума. Кандидату је наведена литература пружила добру теоријску основу да на прави начин уради дискусију добијених резултата.

Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

Најобимнији део докторске дисертације је поглавље резултати и дискусија, које се састоји из 5 подпоглавља. У оквиру поглавља **Резултати и дискусија** прво су истакнути подаци добијени након физичко-хемијске анализе произведених воћних вина у оквиру експеримената 1 и 2. Испитиван је садржај укупних киселина, рН вредност, количина слободног SO₂, количина укупне суве материје (шећера) и садржај алкохола.

Полифенолни састав воћних вина одређен је након анализе узорака помоћу система UPLC-TQ-MS/MS. Анализом вина произведених у оквиру експеримента 1 показана је статистички значајна разлика у садржају полифенолних једињења у узорцима вина произведеним са додатком шећера пре почетка врења у односу на она без додатка ($p < 0,05$). Статистичка значајност једино није приказана код вина произведених од јабуке ($p > 0,05$). Садржај изабраних полифенолних једињења у винима произведеним од ароније, боровнице, малине, купине, јагоде и јабуке је упоређен применом методе једнофакторске анализе варијансе - ANOVA. Од деривата хидроксициметне киселине посебно се истакла хлорогена киселина чији је садржај био највиши у винима од боровнице (390,75-474,34 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$). Поред боровнице и ароније у вину од јагоде је, такође, био висок садржај хлорогене киселине (290,32-335,25 $\mu\text{g/mL}$) док у узорцима вина од малине и купине није пронађена. Вино од боровнице је имало највиши садржај *p*-кумаринске и кафеинске киселине, док су ова два једињења пронађена и у вину од јагоде. Од деривата хидроксибензоове киселине најзаступљенија је била протокатехуинска киселина у вину од ароније (42,53-49,11 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$) као и вину од боровнице, док у малини и јабуци није пронађена. У вину од купине најзаступљенија је била гална (92,15-100,17 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$), док је *p*-хидроксибензоова киселина била главна у вину од јагоде (41,05-53,44 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$). Вино од купине је имало највиши садржај елагинске киселине (132,97-140,20 $\mu\text{g/mL}$) у поређењу са осталим анализираним узорцима ($p < 0,05$). Квантификовани су и флавоноиди епикатехин и катехин, који су били најзаступљенији у винима од јагоде, док је највиши садржај кверцетина пронађен у вину од ароније.

Код вина произведених од коштичавог воћа (вишња, трешња, шљива, бресква и кајсија) присуство шећера и коштице у воћном кљуку је показало статистички значајан ($p < 0,05$) утицај на садржај полифенолних једињења. Такође је утицај винификације и врсте воћа на садржај изабраних полифенолних једињења приказан коришћењем двофакторске ANOVA-е ($p < 0,05$). Садржај хлорогене киселине у вишњи је био највиши (340,46-370,03 $\mu\text{g/mL}$), у односу на сва остала коштичава воћа као и садржај епикатехина, катехина и кверцетина. Узорци вина од трешње имали су највиши садржај протокатехуинске (30,42 $\mu\text{g/mL}$) и ванилинске киселине (17,35 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$) у односу на друга вина од коштичавог воћа. Такође је и садржај хлорогене киселине био висок (355,23 $\mu\text{g/mL}$) и био је виши него у винима од шљиве, кајсије и брескве ($p < 0,05$). Вино од шљиве је имало највиши садржај *p*-хидроксибензоове киселине (15,61-30,48 $\mu\text{g/mL}$) у односу на остала вина од коштичавог воћа ($p < 0,05$). Такође, у овом вину је био и висок садржај хлорогене, протокатехуинске и галне киселине. Хлорогена киселина је била најзаступљеније једињење у винима од брескве (127,15-156,35 $\mu\text{g/mL}$), а у њима је био и највиши садржај кафеинске киселине (3,35-7,42 $\mu\text{g/mL}$) у односу на сва остала вина од коштичавог воћа ($p < 0,05$). Хлорогена киселина била је главно полифенолно једињење и у вину од кајсије (135,33-167,22 $\mu\text{g/mL}$), док су се од деривата хидроксибензоове киселине истакли гална и протокатехуинска киселина.

Резултати добијени у оквиру експеримента 1 истичу да је виши садржај шећера пре почетка врења утицао на виши садржај алкохола који је побољшао екстракцију

појединачних полифенолних једињења. Код вина од коштичавог воћа присуство коштице у винификацији је додатно утицало на повећање садржаја полифенолних једињења. Такође, врста воћа коришћена у винификацији је утицала на садржај полифенолних једињења у различитим винима ($p < 0,05$).

Анализом вина произведених у оквиру експеримента 2 показано је да шећер и ЕПГ статистички значајно утичу на повећање садржаја појединачних полифенолних једињења у узорцима воћних вина ($p < 0,05$). Присуство коштице је утицало на повећање садржаја полифенолних једињења у неким микровинификацијама када је вишња била у питању ($p < 0,05$). Примена различитих квасаца (Lievito Secco и ICV D254) код вина од бобичастиг воћа и јабуке није утицала на повећање садржаја појединачних полифенолних једињења ($p > 0,05$), док код вишње у неким микровинификацијама јесте ($p < 0,05$). Утицај микровинификације и врсте воћа на садржај изабраних полифенолних једињења приказан је коришћењем двофакторске ANOVA-е ($p < 0,05$). Најзаступљеније једињење у вину од вишње је била хлорогена киселина ($695,91-757,43 \mu\text{g/mL}$) чији је садржај био највиши од свих вина произведених у експерименту 2 ($p < 0,05$), док је од деривата хидроксибензојеве киселине била протокатехуинска ($159,32-194,40 \mu\text{g/mL}$). Хлорогена киселина је била главно једињење ($730,88-814,48 \mu\text{g/mL}$) у вину од боровнице, као и кафеинска киселина ($95,77-125,40 \mu\text{g/mL}$), док од флавоноида је био епикатехин ($65,84 \mu\text{g/mL}$). Хлорогена ($827,55 \mu\text{g/mL}$) и протокатехуинска киселина ($724,54 \mu\text{g/mL}$) биле су два најистакнутија једињења у вину од ароније и садржај ова два једињења је био највиши у односу на сва друга вина ($p < 0,05$). Вино од купине је имало највиши садржај галне киселина ($126,40-196,56 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$). Садржај елагинске киселине ($91,76 \mu\text{g/mL}$) је био највиши у купини у поређењу са свим осталим винима ($p < 0,05$). Гална киселина била је најзаступљенија у вину од малине ($127,46-171,70 \mu\text{g/mL}$), док су *p*-хидроксибензојева и синапинска киселина имале највиши садржај у односу на сва друга вина ($p < 0,05$).

На основу резултата добијених за садржај појединачних полифенолних једињења пронађених у свим узорцима урађено је груписање воћних вина РСА методом. Вина од малине и купине су била у првој групи, другој од ароније и боровнице, док је у трећој било вино од вишње.

Резултати у оквиру експеримента 2 истичу да је виши садржај шећера пре почетка врења утицао на виши ниво алкохола у вину и бољу екстракцију полифенолних једињења из воћног кљука. Ензимски препарат гликозидаза је довео до ослобађања агликона полифенолних једињења из гликозида што доприноси повећаном садржају једињења у узорку.

У оквиру вина произведених у експерименту 1 одређена је антиоксидативна активност методом FRAP. Вредности добијене за FRAP воћних вина су кориговане са вредностима за FRAP матрикс раствора направљених у интервалу од 1 до $7\text{g/hL K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Од бобичастиг воћа истакло се вино од купине са додатком шећера које је показало највишу активност ($\text{FRAP}_{\text{кориговано}} = 103,90 \text{ mmol/L Fe}^{2+}$) ($p < 0,05$), док је најнижа показана за вино од малине са додатком шећера ($\text{FRAP}_{\text{кориговано}} = 18,04 \text{ mmol/L Fe}^{2+}$) ($p < 0,05$). Високе вредности су показала и вина од боровнице и ароније. Показана је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у FRAP вредностима код вина са и без додатка шећера пре почетка врења, јер је шећер утицао на виши садржај алкохола који је боље екстраховао једињења одговорна за антиоксидативност воћног вина. Код вина од коштичавог воћа највиша вредност је била у шљиви ($\text{FRAP}_{\text{кориговано}} = 52,75-61,95 \text{ mmol/L Fe}^{2+}$), ($p < 0,05$), а најнижа у брескви ($\text{FRAP}_{\text{кориговано}} = 24,77-31,71 \text{ mmol/L Fe}^{2+}$). Присуство коштице у микровинификацији је утицало на повећање антиоксидативности у узорцима ($p < 0,05$). Вредности добијене за FRAP воћних вина у експерименту 2 истичу да шећер и ЕПГ статистички значајно утичу на повећање антиоксидативне

активности ($p < 0,05$), док различити квасци нису показали статистичку значајност ($p > 0,05$). Највиша вредност била је у вину од купине са додатком шећера и ЕПГ, $FRAP_{\text{кориговано}} = 115,23 \text{ mmol/L Fe}^{2+}$, ($p < 0,05$), а најнижа у вину од малине без додатка шећера и ЕПГ, $FRAP_{\text{кориговано}} = 22,59 \text{ mmol/L Fe}^{2+}$ ($p < 0,05$).

Антирадикалска активност воћних вина показана је према DPPH стабилном радикалу. У експерименту 1 вино од купине са додатком шећера имало је највишу анти-DPPH радикалску активност ($IC_{50} = 1,20\%$) док је најнижа измерена у вину од јабуке без шећера ($IC_{50} = 83,33\%$). Код вина од коштичавог воћа произведених у експерименту 1 највиша активност је пронађена за вишњу са шећером и коштицом (1,66%), док је најнижа била у вину од кајсије без коштице и шећера (72,28%). Код свих вина је у експерименту 1 додаток шећера статистички значајно утицао на повећање антирадикалске активност, као и присуство коштице у микровинификацијама коштичавог воћа. У оквиру експеримента 2 највиша активност показана је за вино купине са шећером и ЕПГ ($IC_{50} = 1,11\%$) док је најнижа била у винима од јабуке без шећера и ЕПГ ($IC_{50} = 87,32\%$). Вина произведена са додатком шећера и ЕПГ пре почетка врења показала су бољу антирадикалску активност.

У оквиру експеримента 1 највиша вредност за садржај укупних полифенола је била у вину од ароније са додатком шећера (2414,61 mg GAE/L) ($p < 0,05$), док је најнижи садржај био у вину од јабуке без додатка шећера (584,28 mg GAE/L) ($p < 0,05$). Вино од боровнице такође је имало висок садржај укупних полифенола. Вина произведена са додатком шећера показала су виши садржај укупних полифенола у односу на она без ($p < 0,05$). Код вина од коштичавог воћа произведених у оквиру експеримента 1 највише вредности забележене су у винима од вишње (1899,90-2180,63 mg GAE/L) ($p < 0,05$), док су најниже биле у брескви (480,72-617,85 mg GAE/L) ($p < 0,05$). Додатак шећера пре врења и присуство коштице у микровинификацијама коштичавог воћа су значајно утицали на повећање садржаја укупних полифенола ($p < 0,05$). У оквиру експеримента 2 највиши садржај укупних полифенола је пронађен у вину од ароније (2520,40 mg GAE/L), док је најнижи био у малини (1441,61 mg GAE/L). Високе вредности показала су вина од боровнице, купине и вишње. Добијене вредности за воћна вина истичу да шећер и ЕПГ статистички значајно утичу на повећање садржаја укупних полифенола ($p < 0,05$), док различити квасци нису показали статистичку значајност ($p > 0,05$).

Анти α -глюкозидазна активност је одређена за узорке вина у експерименту 1 и 2. Претходно је узорак у оба експеримента припремљен лиофилизацијом због интерференција етанола на методу примењену за одређивање анти- α глюкозидазне активности. Од вина произведених у експерименту 1 испитивана је анти α -глюкозидазна активност вина од малине, купине, ароније, боровнице и вишње. Вина од боровнице ($IC_{50} = 24,17-46,32 \mu\text{g/mL}$) су се истакла као најбољи инхибитори, док су најслабији инхибитори били узорци вина од вишње са коштицом и без шећера ($IC_{50} = 67,15 \mu\text{g/mL}$) и малине ($IC_{50} = 37,25-56,93 \mu\text{g/mL}$). Показана је статистичка значајност ($p < 0,01$) за вредности IC_{50} узорака воћних вина произведених са и без додатка шећера у воћни кљук пре почетка врења. Узорци воћних вина произведени са додатком шећера пре почетка врења показали су вишу анти- α глюкозидазну активност у односу на оне где није додаван шећер. Од вина произведених у експерименту 2 испитивана је анти α -глюкозидазна активност вина од малине, купине, ароније, боровнице и вишње. Узорци вина од боровнице ($IC_{50} = 27,51-29,45 \mu\text{g/mL}$) и ароније ($IC_{50} = 28,51-30,31 \mu\text{g/mL}$) са додатком шећера и ЕПГ-а били су најактивнији. Вина од вишње без додатка шећера и ЕПГ-а ($IC_{50} = 71,58-73,47 \mu\text{g/mL}$) и малине ($IC_{50} = 59,17-60,82 \mu\text{g/mL}$) показала су најнижу активност. Узорци воћних вина произведени са додатком шећера и ензима пре почетка врења показали су статистички значајно вишу инхибиторну активност од других

узорака ($p < 0,01$). Ензим је имао за циљ да повећа садржај полифенолних једињења у крајњем производу, воћном вину. У експерименту 2 није показана статистичка значајност ($p \geq 0,05$) за вредности IC_{50} узорака воћних вина произведених помоћу различитих квасаца (Lievito Secco и ICV D254). На основу анти α -глюкозидазне активност стандарда појединачних полифенолних једињења квантификованих у воћним винима, одређен је њихов допринос IC_{50} вредностима узорака воћних вина. Највећу инхибиторну активност показали су стандарди елагинске ($IC_{50} = 7,98 \times 10^{-6}$ М) и хлорогене киселине ($IC_{50} = 4,83 \times 10^{-5}$ М). Такође ова два једињења, елагинска (-9,1 kcal/mol) и хлорогена киселина (-8,5 kcal/mol) су показала висок афинитет према α -глюкозидази у молекуларној докинг студији. Код вина произведених у експерименту 1 хлорогена киселина је највише доприносила IC_{50} вредности вина од боровнице (14,26-18,31%), ароније (12,69-16,75%) и вишње (13,96-18,31%). Такође је гална киселина доприносила вину од купине (5,86-6,15%) и малине (3,37-4,30%). Елагинска киселина је највише доприносила вину од купине (16,52-16,69%). Од флавоноида епикатехин је доприносио највише вину од малине и вишње. Код вина произведених у експерименту 2 хлорогена киселина је највише доприносила вину од боровнице (19,02-25,25%), ароније (16,47-19,57%) и вишње (23,05-31,27%). Као и код узорака у експерименту 1 гална киселина доприносила је вину од купине (5,86-6,15%) и малине (4,45-6,11%). Кафеинска киселина доприносила је највише вину од вишње (7,47-7,90%), док је значајно учествовала и у инхибиторној активности вина од боровнице (5,67-7,13%) и ароније (4,78-6,15%). Протокатехуинска киселина доприносила је највише винима од ароније (6,55-8,35%), купине (6,18-6,74) и вишње (5,31-6,57%).

Праћена је активност лиофилизата воћних вина на параметре оксидативног стреса и то вина произведених у експерименту 2 из микровинификација без додатка шећера и ензима, као и са додатком шећера и ензима. Воћна вина су лиофилизована да би се избегао утицај етанола из вина на активност ензима и липидну пероксидацију током експеримента. Сви лиофилизати воћних вина утицали су на повећану активност ензима антиоксидативне заштите и снижење садржаја малон-диалдехида (MDA). Највиша активност за супероксид дисмутазу примећена је код синаптозома третираних лиофилизатом вина од купине, а најнижа од јабуке. Највиша активност за каталазу је примећена код синаптозома третираних лиофилизатом вина од боровнице, док је најнижа била показана за лиофилизат вина од јабуке. Највиша активност за глутатион пероксидазу примећена је код синаптозома третираних лиофилизатом вина од боровнице, док је најмање изражена активност била за лиофилизат вина од вишње. Најниже вредности за MDA су биле у синаптозомима третираним лиофилизатом од ароније, који се показао као најбољи у заштити од липидне пероксидације, док је највиши садржај за MDA био је у винима од јабуке. Додатак ензима и шећера воћном кљуку пре почетка врења показао је статистички значајну разлику ($p < 0,05$) за вредности испитиваних параметара оксидативног стреса док применом различитих квасаца то није био случај ($p > 0,05$).

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Присуство киселина у вину и рН вредност су два параметра који су одговорни за укус, боју, стабилност и сазревање вина. Укупне киселине имају утицај на количину слободног SO_2 који штити вино од микробиолошког кварења. (Milovanovic et al., 2019).

Садржај киселина изражен у односу на јабучну киселину у воћним винима зависи од воћа од кога је произведено па је тако у вину од боровнице 2,8 g/L, купине 3,5 g/L (Johnson and Gonzalez de Mejia, 2011), малине 1,5 g/L (Ryan and Dupont, 1973), јабуке 6,2 g/L и вишње 6,82 g/L (Martin et al., 1971). Код воћних вина рН вредности могу да буду различите и зависе од воћа од кога је произведено, тако да вино од црне шљиве има рН 2,7 (Okigbo, 2003), од банане рН 3,3 (Akubor et al., 2003), док је у вину од ананаса рН 3,7 (Chanprasartsuk et al., 2012). Када је рН вредност код вина виша од 3,6 микробиолошка нестабилност вина је већа, док ниже рН вредности доприносе бољој стабилности. То је због тога, јер се спречава кварење и развој бактерија и повећава количина слободног SO₂ (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Сумпор диоксид (SO₂) је најчешћи антиоксиданс који се користи у производњи хране и пића. Током производње вина улога SO₂ је да спречи раст нежељених квасаца и бактерија које могу да доведу до кварења вина и добијања производа који има непријатан укус и мирис (Oliveira et al., 2011). Према Правилнику о квалитету и другим захтевима за вино Службени гласник РС, 26/2015 (2015) укупни садржај SO₂ због здравствених разлога је ограничен зависно од типа вина. Количина алкохола у воћном вину зависи од технологије која се примењује у производњи и најчешће је у интервалу од 5 до 15%. Воће које се користи за производњу вина нема довољно шећера у поређењу са грождем да би се постигао задовољавајући ниво алкохола, па се зато шећер додаје пре почетка врења. Тако је у Великој Британији садржај алкохола од 4 до 22% v/v (WSTA, 2015), САД-у мање од 14% v/v (CFR, 2015), Бразилу од 4 до 14% v/v (Brasil, 2009). Европско удружење за производњу сидера и воћних вина је дало вредности за садржај алкохола од 1,2 до 14% v/v (AICV, 2014). Садржај етанола у винима од купине и боровнице је био од 9 до 12% v/v (Johnson and Gonzalez de Mejia, 2011), у вину од шљиве од 6 до 13,5% v/v (Bhardwaj and Joshi, 2009), у вину од вишње од 10 до 13% v/v (Niu et al., 2012). Неко воће, као што су јабуке, када се прерађују у вино захтевају додаток шећера за постизање нивоа алкохола од 5% v/v, што је просечна вредност у европским винима, до високих 15% v/v који карактерише вина из Републике Кореје (Lee et al., 2013), док је вино од брескве имало садржај алкохола 8,1% v/v (Davidović et al., 2013). Тренутно у Србији не постоје законски прописи који се односе на воћна вина, али се могу истаћи неки у свету и то у Аустрији - Austrian Wine Act (2009), Бразилу (2009), Новом Зеланду - MAF (2011), Великој Британији - WSTA (2015), САД - CFR (2015) и прописи Европског удружење за производњу сидера и воћних вина-AICV(2014).

Висок садржај полифенолних једињења је посебо истакнут у воћу са тамном покожицом, аронији, боровници и купини. Литературни подаци истичу присуство хлорогене киселине у боровници (Zheng and Wang, 2003), јагоди (Mandave et al., 2014), малини (Kähkönen et al., 2001), али и сорти јабуке јонаголд која је коришћена за производњу вина у оквиру наших експеримената (Awad and de Jager, 2000). Поред хлорогене интересантно је истаћи још неке деривате хидроксициметне киселине у боровници, јагоди и купини, као што су *p*-кумаринска и кафеинска киселина (Häkkinen et al., 1999a; Zadernowski et al., 2005; Guerrero-Chavez et al., 2015; Mattila et al., 2006). Међу дериватима хидроксибензоеле киселине у јагоди су истакнуте *p*-хидроксибензоеле, протокатехуинска и ванилинска киселина (Guerrero-Chavez et al., 2015; Mattila et al., 2006), протокатехуинска је из ове групе најзаступљенија у боровници (Zadernowski et al., 2005), док је елагинска киселина пронађена у купини (Türkben et al., 2010; Siriwoharn and Wrolstad, 2006) и аронији (Szwajgier et al., 2014). Поред слободног облика, литературни подаци истичу присуство елагинске киселине у облику олигомерних молекула и то са растворљивим танинима у јагодама, малинама и купинама (Manach et al., 2004). Истраживања су истакла да елагинска киселина показује дугорочан позитиван утицај на људски организам (Koronen et al., 2007). Литературни

подаци истичу аронију као један од најбогатијих извора хлорогене, кафеинске и *p*-кумаринске киселине (Grunovaitè et al., 2016; Szwajgier et al., 2014), док је пронађена и *p*-хидроксибензоева киселина (Szwajgier et al., 2014). Поред боровнице и ароније, купина се, такође, истиче као богат извор фенолних киселина. Литературни подаци истичу висок садржај протокатехуинске (Zadernowski et al., 2005), док су откривене и гална и ванилинска киселина (Klarić et al., 2011; Zadernowski et al., 2005). Поред светлије покожице малина се истиче као богат извор *p*-хидроксибензоеве (Häkkinen et al., 1999a) и протокатехуинске киселине (Mattila and Kumpulainen, 2002), док су *p*-кумаринска и кафеинска киселина такође пронађене у вину од малине (Häkkinen et al., 1999a; Mattila and Kumpulainen, 2002). Од флавоноида литературни подаци су истакли присуство епикатехина, катехина и кверцетина. Воће са тамном покожицом као што су боровница, аронија и купине су биле добар извор епикатехина и катехина (de Pascual-Teresa et al., 2000; Arts et al., 2000a) као и кверцетина (Häkkinen et al., 1999a). За разлику од тамног воће са црвеном покожицом, малине (Arts et al., 2000a; Häkkinen et al., 1999b) и јагоде (Guerrero-Chavez et al., 2015; Mandave et al., 2014; Milivojević et al., 2011), су имале нешто нижи садржај катехина, епикатехина и кверцетина. Вино произведено од коштичавог воћа, посебно оног са тамном покожицом истиче се по богатом садржају фенолних киселина.

Литературни подаци истичу хлорогену као главну фенолну киселину у вину од вишње (Czyzowska and Pogorzelski, 2002; Pantelić et al., 2014), док су се од деривата хидроксибензоеве киселине посебно истакли протокатехуинска (Pantelić et al., 2014; Szwajgier et al., 2014) и ванилинска киселина (de Pascual-Teresa et al., 2000). Садржај катехина и његовог епимера је био у сагласности са литературним подацима (de Pascual-Teresa et al., 2000). Један од најзаступљенијих флавонола у вину од вишње је био кверцетин (Justesen et al., 1998). Друго коштичаво воће са тамном покожицом, трешња, истакло се по садржају хлорогене (González-Gómez et al., 2010; Jakobek et al., 2009; Usenik et al., 2008), док су и друге две хидроксициметне киселине, кафеинска и *p*-кумаринска такође откривене (Jakobek et al., 2009; Xiao et al., 2015). Деривати хидроксибензоеве киселине, протокатехуинска и ванилинска су посебно биле заступљене у високом садржају (Martini et al., 2017; Xiao et al., 2015). Од флавоноида у трешњи су се посебно истакли епикатехин, кверцетин и кемпферол (Jakobek et al., 2009; Martini et al., 2017). Као и претходна коштичава воћа са тамном покожицом, шљива је била богат извор хлорогене (Cendres et al., 2012; Will and Dietrich, 2006) и других хидроксициметних киселина (Milala et al., 2013). Поред тога откривени су и деривти хидроксибензоеве киселине, протокатехуинска и гална киселина (Kaulmann et al., 2014; Khallouki et al., 2012). Од флавоноида у шљиви у литературним подацима су се истакли посебно кверцетин и епикатехин (Cendres et al., 2012; Will and Dietrich, 2006). Коштичаво воће са светлом покожицом је имало нешто нижи садржај фенолних киселина у односу на оно са тамним. Подаци истичу хлорогену киселину као најзаступљенију у брескви (Saidani et al., 2017; Khumalo et al., 2017; Liu et al., 2018), док је био нижи садржај кафеинске киселине (Khumalo et al., 2017). Деривати хидроксициметне и хидроксибензоеве киселине су откривени у винима од брескве из Србије (Davidović et al., 2013). Као и код брескве и у кајсији литературни подаци истичу хлорогену као главну фенолну киселину (Carbone et al., 2018; Dragovic-Uzelac et al., 2005), док су пронађене *p*-кумаринска (Fan et al., 2018) и кафеинска киселина (Iguál et al., 2012). Од деривата хидроксибензоеве истакле су се гална и протокатехуинска киселина (Fan et al., 2018; Iguál et al., 2012). Литературни податак истиче значај примене ЕПГ-а у микровинификацијама са циљем ослобађања полифенолних једињења из гликозида, као што је показанао у случају повећања садржаја слободних изомера резвератрола (Eder et al., 2000).

Антиоксидативна активност мерена методом FRAP истиче купину, боровницу, аронију као воћа са високим вредностима (Pantelidis et al., 2007; Sánchez-Moreno et al., 2003), док је нешто нижа у јагоди (Klorotek et al., 2005). Овакве резултате потврђује још једна студија (Kalkan Yildirim, 2006), која истиче најнижу антиоксидативност вина од јабуке у односу на бобичасто и јагодичасто воће. Високе вредности добијене методом FRAP за купину истакнуте су у студији спроведеној у Србији (Mitic et al., 2014), као и у још две из САД-а (Siriwoharn and Wrolstad, 2006; Moyer et al., 2002). Више вредности добијене методом FRAP за аронју, боровницу и купину у односу на малину и коштичаво воће истичу такође још неке студије (Rupasinghe and Clegg, 2007; Pellegrini et al., 2003; Kalkan Yildirim, 2006). Поред тога коштичаво воће са тамном pokožицом (вишња, трешња и шљива) су показале вишу антиоксидативну активност методом FRAP него кајсија и бресква (Contessa et al., 2013; Pellegrini et al., 2003; Kalkan Yildirim, 2006). Добијене FRAP вредности за вино од брескве су у складу са литературним подацима за овај параметар и истакнути су за различите сорте овог воћа (Liu et al., 2015).

Највиша антирадикалска активност према DPPH радикалу показана је за вино од купине и литературно је потврђена у студији која је испитивала вино од купине из Србије (Mitic et al., 2014), као и у студији из Републике Кореје (Ku and Mun, 2008). Вина произведена од воћа са црвеном pokožицом, јагода и малина, показала су добру антирадикалску активност, али је била нижа од оне за вино од купине (Castilho Maro et al., 2013; Xu et al., 2014). Од коштичавог воћа литературни подаци истичу вино од трешње сорте бурлат где су вредности за анти-DPPH радикалску активност биле нешто ниже него код купине (Usenik et al., 2008), док је кајсија показала најнижу активност (Carbone et al., 2018).

Литературни подаци истичу највиши садржај укупних полифенола у аронији (Zheng and Wang, 2003) и боровници (Prior et al., 1998; Sánchez-Moreno et al., 2003), док је у јабуци садржај био најнижи (Rupasinghe and Clegg, 2007). У јагоди (Chaves et al., 2017; Contessa et al., 2013; Mandave et al., 2014) и малини (Moyer et al., 2002) је СУП био нешто нижи у односу на воће са тамном и тврдом pokožицом које је показало највише вредности (Heinonen et al., 1998). Од вина произведеног од коштичавог воћа највиша вредност је била у онима од вишње (Mitić et al., 2013), трешње сорте бурлат (Liu et al., 2015), док је вино од шљиве показало више вредности од кајсије и брескве (Contessa et al., 2013; Rupasinghe and Clegg, 2007; Liu et al., 2015).

Постпрандијална хипергликемија може се контролисати храном биљног порекла. Већина природних инхибитора α -глукозидазе показује слабије нежељене ефекте (болове у стомаку, надутост и дијареу) од неких синтетичких инхибитора (Adisakwattana et al., 2009; Su et al., 2018; Vinholes et al., 2017; Zhao et al., 2016). Воћна вина, такође, поседују то својство где се посебно истичу као најбољи инхибитори она произведена од боровнице (Johnson et al., 2011; McDougall et al., 2005), ароније (Wangensteen et al., 2014), купине (Sarkar et al., 2016) док је малина показала нешто нижу активност (Zhang et al., 2010). Од коштичавог воћа литературни подаци истичу вишњу (Nowicka et al., 2016). Једињења одговорна за α -глукозидазну инхибиторну активност налазе се у чврстим деловима воћа (пokoжици и семенци) тако да њихова екстракција представља важан корак у повећању позитивних здравствених ефеката производа од воћа као што је воћно вино (Wang et al., 2012). Литературни подаци истичу да неке од фенолних киселина укључујући кафеинску, протокатехуинску и галну, откривене у воћним винима, такође, имају способност да инхибирају α -глукозидазу (Kwon et al., 2006; Oboh et al., 2016). Поред ових и хлорогена киселина која је једна од најдоминантнијих у воћним винима показује хипогликемијску активност (Hemmerle et al., 1997; Kwon et al., 2008). Важно је истаћи да инхибиторна

активност према α -глукозидази је резултат синергистичког ефекта свих биолошки активних једињења која доприносе укупној инхибиторној активности према ензиму (Suraiya et al., 2018; Bräunlich et al., 2013)

Активност биолошки активних једињења воћних вина према параметрима оксидативног стреса, и то посебно ензимима антиоксидативне заштите може да буде различита. Тако неке од студија истичу повишену активност каталазе у присуству флавоноида (Elavarasan et al., 2012; Noguer et al., 2012; Sun et al., 2011), док у другима није било утицаја, или је чак дошло до неког снижења (Doronicheva et al., 2007; Simos et al., 2012). Слично је било и у студијама где су праћене активности супероксид дисмутазе и глутатион пероксидазе које су у присуству вина биле повишене (Noguer et al., 2012; Srikanta et al., 2016; Lingua et al., 2016), а било је и случајева снижења њихове активности (Estruch et al., 2011). Од појединачних једињења пронађених у воћним винама која су повећавала активности ензима антиоксидативне заштите истичу се *p*-кумаринска (Yen et al., 2011), кафеинска (Jung et al., 2006) и гална киселина (Punithavathi et al., 2011). Утицај екстракта купине и малине на повећање активности ензима антиоксидативне заштите је показан у експериментално изазваном оксидативном стресу код животиња (Cho et al., 2011; Sangiovanni et al., 2013), док је аронија повећала активност ових ензима код здравих добровољаца (Kardum et al., 2014). Такође је битно истаћи способност вина и воћа у снижавању нивоа MDA код експерименталних животиња и људи (de Figueiredo et al., 2017; Deiana et al., 2012; Miller and Shukitt-Hale, 2012).

Литература:

- Adisakwattana, S., et al., 2009. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal α -glucosidase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24, 1194–1200.
- AICV, 2014. Association of the cider and fruit wine industry of the European Union, Code of Practice
<http://www.aicv.org/pages/aicv/definitions.html>
<http://aicv.org/file.handler?f=CiderTrends2014.pdf>. Приступљено 06.11.2018.
- Akubor, P.I., et al., 2003. Production and quality evaluation of banana wine. *Plant Foods Hum. Nutr.* 58, 1–6.
- Arts, I.C.W., et al., 2000a. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1746–1751.
- Aruoma, O.I., et al., 1989. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem. J.* 258, 617 LP-620.
- Austrian Wine Act, 2009. Federal Act on the marketing of wine and fruit-made wine. *Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich*, Part I, No. 111, November 17, 2009. 35 pp <http://faolex.fao.org/docs/pdf/aut97740.pdf> Приступљено 06.11.2018.
- Awad, M.A. and de Jager, A., 2000. Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 15–24.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.
- Beutler, E., 1984. *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods* (third ed.).

- Grune and Startton, New York, USA p. 133
- Bhardwaj, J. and Joshi, V., 2009. Effect of cultivar, addition of yeast type, extract and form of yeast culture on foaming characteristics, secondary fermentation and quality of sparkling plum wine. *Nat. Prod. Radiance* 8, 452–464.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199.
- Brasil, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, Brasília, DF.
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-010/2009/Decreto/D6871.htm.
Приступљено 06.11.2018.
- Bräunlich, M., et al., 2013. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutr.* 5, 663–678.
- Carbone, K., et al., 2018. Chemometric classification of early-ripening apricot (*Prunus armeniaca*, L.) germplasm based on quality traits, biochemical profiling and in vitro biological activity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 227, 187–195.
- Castilho Maro, L.A., et al., 2013. Bioactive compounds, antioxidant activity and mineral composition of fruits of raspberry cultivars grown in subtropical areas in Brazil. *Fruits* 68, 209–217.
- Cendres, A., et al., 2012. Comparison between microwave hydrodiffusion and pressing for plum juice extraction. *LWT - Food Sci. Technol.* 49, 229–237.
- CFR, 2015. Code of federal regulations. Title 27-Alcohol, tobacco products and firearms. Chapter I – Alcohol and tobacco tax and trade bureau, department of the treasury. Subchapter a – alcohol. part 4-labeling and advertising of wine. Subpart C –standards of identity for wine. Section 4.21-The Standards of Identity http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=82a2effe84149c7b68fa58a0b12e4cb8andmc=trueandtpl=/ecfrbrowse/Title27/27cfrv1_02.tpl#0. Приступљено 06.11.2018
- Chanprasartsuk, O., et al., 2012. Pineapple wine fermentation with yeasts isolated from fruit as single and mixed starter cultures. *Asian J. Food Agro -Industry* 5, 104–111.
- Chaves, V.C., et al., 2017. Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivars. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 225, 293–298.
- Cho, B.O., et al., 2011. Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11442–11448.
- Contessa, C., et al., 2013. Total antioxidant capacity and total phenolic and anthocyanin contents in fruit species grown in Northwest Italy. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 160, 351–357.
- Czyzowska, A. and Pogorzelski, E., 2002. Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part I. Total polyphenols and phenolic acids. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 148–154.
- Davidović, S.M., et al., 2013. Physicochemical, antioxidant and sensory properties of peach wine made from Redhaven cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1357–1363.
- de Figueiredo, E.A., et al., 2017. Antioxidant and antihypertensive effects of a chemically

- defined fraction of syrah red wine on spontaneously hypertensive rats. *Nutrients* 9, 10–23.
- de Pascual-Teresa, S., et al., 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5331–5337.
- Deiana, M., et al., 2012. Wine extracts from Sardinian grape varieties attenuate membrane oxidative damage in Caco-2 cell monolayers. *Food Chem.* 134, 2105–2113.
- Doronicheva, N., et al., 2007. Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 213–217.
- Dragovic-Uzelac, V., et al., 2005. The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity. *Food Chem.* 91, 373–383.
- Eder, R., et al., 2000. Influence of viticultural and enological factors on the concentration of resveratrols in grapes and wine. 25th Congress Mondial de la Vigne et du Vin, Paris, France, p. 79–86.
- Elavarasan, J., et al., 2012. Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 1472–1482.
- Estruch, R., et al., 2011. Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases erythrocyte superoxide dismutase activity: A randomised cross-over trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 21, 46–53.
- Fan, X., et al., 2018. Improving fresh apricot (*Prunus armeniaca* L.) quality and antioxidant capacity by storage at near freezing temperature. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 231, 1–10.
- González-Gómez, D., et al., 2010. Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *J. Food Compos. Anal.* 23, 533–539.
- Gorjanović, S.Ž., et al., 2010. Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4626–4631.
- Grunovaitė, L., et al., 2016. Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *J. Funct. Foods* 24, 85–96.
- Guerrero-Chavez, G., et al., 2015. Influence of the site altitude on strawberry phenolic composition and quality. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 192, 21–28.
- Häkkinen, S., et al., 1999a. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res. Int.* 32, 345–353.
- Häkkinen, S., et al., 1999b. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2274–2279.
- Heinonen, I.M., et al., 1998. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agric. Food Chem.* 46, 25–31.
- Hemmerle, H., et al., 1997. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J. Med. Chem.* 40, 137–145.
- Igual, M., et al., 2012. Effect of processing on the drying kinetics and functional value of

- dried apricot. *Food Res. Int.* 47, 284–290.
- Jakobek, L., et al., 2009. Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 123, 23–28.
- Johnson, M.H., et al., 2011. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase by Highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). *J. Agric. Food Chem.* 59, 8923–8930.
- Johnson, M.H. and Gonzalez de Mejia E., 2011. Comparison of chemical composition and antioxidant capacity of commercially available blueberry and blackberry wines in Illinois. *J. Food Sci.* 77, C141–C148.
- Jung, U.J., et al., 2006. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 476 LP-483.
- Justesen, U., et al., 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 799, 101–110. 23–28.
- Kähkönen, M.P., et al., 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4076–4082.
- Kalkan Yildirim, H., 2006. Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57, 47–63.
- Kardum, N., et al., 2014. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J. Funct. Foods* 9, 89–97.
- Kaulmann, A., et al., 2014. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chem.* 155, 240–250.
- Khallouki, F., et al., 2012. Phytochemical composition and antioxidant capacity of various botanical parts of the fruits of *Prunus domestica* L. from the Lorraine region of Europe. *Food Chem.* 133, 697–706.
- Khumalo, K.N., et al., 2017. Effect of thyme oil vapour exposure on the brown rot infection, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, phenolic content and antioxidant activity in red and yellow skin peach cultivars. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 214, 195–199.
- Klarić, D.A., et al., 2011. Polyphenol content and antioxidant activity of commercial blackberry wines from Croatia: Application of multivariate analysis for geographic origin differentiation. *J. Food Nutr. Res.* 50, 199–209.
- Klopotek, Y., et al., 2005. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5640–5646.
- Koponen, J.M., et al., 2007. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1612–1619.
- Ku, C.S. and Mun, S.P., 2008. Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. *Bioresour. Technol.* 99, 8325–8330.

- Kwon, Y.I., et al., 2006. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 15, 107–118.
- Kwon, Y. I., et al., 2008. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J. Food Biochem.* 32, 15–31.
- Lee, J.-H., et al., 2013. Evaluation of physicochemical properties and fermenting qualities of apple wines added with medicinal herbs. *Food Sci. Biotechnol.* 22, 1039–1046.
- Lingua, M.S., et al., 2016. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *J. Funct. Foods* 20, 332–345.
- Liu, H., et al., 2015. Evaluation of physiochemical and antioxidant activity changes during fruit on-tree ripening for the potential values of unripe peaches. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 193, 32–39.
- Liu, H., et al., 2018. A combination of 1-methylcyclopropene treatment and intermittent warming alleviates chilling injury and affects phenolics and antioxidant activity of peach fruit during storage. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 229, 175–181.
- MAF, 2011. Wine Standards Management Plan Code of Practice for Fruit Wine, Cider and Mead. Ministry of Agriculture and Forestry. Manager, Food Standards. New Zealand Standards Group. <http://foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/wine-standards-management-wsmc-cop-fwcm/cop.pdf>.
- Manach, C., et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Mandave, P.C., et al., 2014. Comprehensive evaluation of in vitro antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two commercially important strawberry varieties. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 172, 124–134.
- Markwell, M.A.K., et al., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.
- Martin, G.E., et al., 1971. Determination of fixed acids in commercial wines by gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 19, 995–998.
- Martini, S., et al., 2017. Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars. *Food Res. Int.* 97, 15–26.
- Mattila, P. and Kumpulainen, J., 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3660–3667.
- Mattila, P., et al., 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7193–7199.
- McCue, P., et al., 2005. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti angiotensin I converting enzyme potential of selected foods. *J. Food Biochem.* 29, 278–294.
- McDougall, G.J., et al., 2005. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2760–2766.
- Miller, M.G. and Shukitt-Hale, B., 2012. Berry fruit enhances beneficial signaling in the brain. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5709–5715.

- Milala, J., et al., 2013. Plum pomaces as a potential source of dietary fibre: composition and antioxidant properties. *J. Food Sci. Technol.* 50, 1012–1017.
- Milivojević, J., et al., 2011. Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild fragaria and rubus berries. *J. Food Qual.* 34, 1–9.
- Milovanovic, M., et al., 2019. A novel method for classification of wine based on organic acids. *Food Chem.* 284.
- Misra, H.P. and Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Mitic, V., et al., 2014. Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia. *Fruits* 69, 413–422.
- Mitić, M.N., et al., 2013. Free radical scavenging activity and phenolic profile of selected Serbian red fruit wines. *Rev. Chim.* 64, 68–73.
- Moyer, R.A., et al., 2002. Anthocyanins, Phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519–525.
- Niu, Y., et al., 2012. Characterization of taste-active compounds of various cherry wines and their correlation with sensory attributes. *J. Chromatogr. B* 902, 55–60.
- Noguer, M.A., et al., 2012. Intake of alcohol-free red wine modulates antioxidant enzyme activities in a human intervention study. *Pharmacol. Res.* 65, 609–614.
- Nowicka, P., et al., 2016. Evaluation of phytochemicals, antioxidant capacity, and antidiabetic activity of novel smoothies from selected Prunus fruits. *J. Funct. Foods* 25, 397–407.
- Oboh, G., et al., 2016. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *J. Food Drug Anal.* 24, 627–634.
- Okigbo, R.N., 2003. Fermentation of black plum (*Vitex doniana* Sweet) juice for production of wine. *Fruits* 58, 363–369.
- Oliveira, M.E.S., et al., 2011. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. *Food Res. Int.* 44, 2391–2400.
- Pantelić, M., et al., 2014. Chemical characterization of fruit wine made from oblačinska sour cherry. *Sci. World J.* 2014.
- Pantelidis, G.E., et al., 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* 102, 777–783.
- Pellegrini, N., et al., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays 1. *J. Nutr* 133, 2812–2819.
- Prior, R.L., et al., 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2686–2693.
- Punithavathi, V.R., et al., 2011. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 465–471.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2006b. Handbook of

- Enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatment, vol. 2. John Wiley and Sons.
- Rupasinghe, H.P.V. and Clegg, S., 2007. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *J. Food Compos. Anal.* 20, 133–137.
- Ryan, J.J. and Dupont, J.A., 1973. Identification and analysis of the major acids from fruit juices and wines. *J. Agric. Food Chem.* 21, 45–49.
- Saidani, F., et al., 2017. Phenolic, sugar and acid profiles and the antioxidant composition in the peel and pulp of peach fruits. *J. Food Compos. Anal.* 62, 126–133.
- Sánchez-Moreno, C., et al., 2003. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from Highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4889–4896.
- Sangiovanni, E., et al., 2013. Ellagitannins from Rubus Berries for the Control of Gastric Inflammation: In Vitro and In Vivo Studies. *PLoS One* 8, 1–12.
- Sarkar, D., et al., 2016. Evaluation of phenolic bioactive-linked functionality of blackberry cultivars targeting dietary management of early stages type-2 diabetes using *in vitro* models. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 212, 193–202.
- Simos, Y. V., et al., 2012. Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo. *Redox Rep.* 17, 181–186.
- Siriwoharn, T. and Wrolstad, R.E., 2006. Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *J. Food Sci.* 69, FCT233-FCT240.
- Srikanta, A.H., et al., 2016. The antioxidant effect of mulberry and jamun fruit wines by ameliorating oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Food Funct.* 7, 4422–4431.
- Su, N., et al., 2018. Quality properties, flavor and hypoglycemia activity of Kiwifruit-Bitter gourd fermented milks. *Food Biosci.* 22, 139–145.
- Sun, L., et al., 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2689–2696.
- Suraiya, S., et al., 2018. Monascus spp. fermented brown seaweeds extracts enhance bio-functional activities. *Food Biosci.* 21, 90–99.
- Szwajgier, D., et al., 2014. Influence of different heat treatments on the content of phenolic acids and their derivatives in selected fruits 69, 167–178.
- Türkben, C., et al., 2010. Effect of Freezing and Frozen Storage on Phenolic Compounds of Raspberry and Blackberry Cultivars. *Food Anal. Methods* 3, 144–153.
- Usenik, V., et al., 2008. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 107, 185–192.
- Vinholes, J., et al., 2017. In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. *Food Biosci.* 19, 92–100.
- Wang, S.Y., et al., 2012. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chem.* 132, 1759–1768.
- Wangensteen, H., et al., 2014. Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *J. Funct. Foods* 7,

- 746–752.
- Wendel, A., 1980. Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, New York, USA p. 333.
- Will, F. and Dietrich, H., 2006. Optimised processing technique for colour- and cloud-stable plum juices and stability of bioactive substances. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 419–425.
- Woraratphoka, J., et al., 2007. Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chem.* 104, 1485–1490.
- WSTA, 2015. The code of practice of the British wine producers' committee of the wine and spirit trade association. <http://www.wsta.co.uk/images/Committees/bwpccode.pdf>. Приступљено 06.11.2018.
- Xiao, Z., et al., 2015. Effect of cultivar and variety on phenolic compounds and antioxidant activity of cherry wine. *Food Chem.* 186, 69–73.
- Xu, F., et al., 2014. Effect of blue light treatment on fruit quality, antioxidant enzymes and radical-scavenging activity in strawberry fruit. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 175, 181–186.
- Yen, G.-C., et al., 2011. Effects of polyphenolic compounds on tumor necrosis factor- α (TNF α)-induced changes of adipokines and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* 59, 546–551.
- Zadernowski, R., et al., 2005. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2118–2124.
- Zhang, L., et al., 2010. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chem.* 119, 592–599.
- Zhao, Y., et al., 2016. A review of flavonoids from cassia species and their biological activity. *Curr. Pharm. Biotechnol.*
- Zheng, W. and Wang, S.Y., 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* 51, 502–509.
- Правилнику о квалитету и другим захтевима за вино (2015). Службени гласник Републике Србије, 87/2011 и 26/2015.

Г. ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу приказа, анализе и одговарајуће дискусије експериментално утврђених резултата, кандидат је у посебном поглављу - **Закључак** јасно, недвосмислено и сажето дефинисао више конкретних и корисних закључака. Закључено је да додатак шећера пре отпочињања алкохолног врења утиче на виши садржај алкохола у воћном вину и бољу екстракцију полифенолних једињења из чврстих делова кљука. Примена ЕПГ-а доприноси повећању количине слободних (агликонских) облика полифенолних једињења. Истовремена примена ЕПГ-а и додаток шећера допринели су повећању количине полифенолних једињења. Са друге стране дат је велики научни допринос, јер су извршена груписања вина, произведених од

различитих домаћих врсти воћа, на основу њихових најдоминантнијих полифенолних једињења. У зависности од природе полифенолних једињења и примењеног третмана у микровинификацији, јасно су се издвојила вина од малине и купине у односу на вино од вишње, као и она од ароније и боровнице. Вина добијена додатком шећера и ЕПГ-а у воћни кљук показала су најбоља антиоксидативна својства FRAP и DPPH методом као и највиши садржај укупних полифенола. Резултати ових истраживања представљају допринос литератури из ове области, а посебно се истичу подаци о утицају полифенолних једињења воћних вина на инхибицију α -глукозидазе. Вина произведена од боровнице и ароније, са и без додатка шећера у воћни кљук показала су се као најбољи инхибитори α -глукозидазе. Полифенолна једињења из воћних вина кумулативно доприносе инхибицији α -глукозидазе. Технолошки поступак производње који је подразумевао додаток ензима и шећера воћном кљуку пре почетка врења показује статистички значајну разлику на активност ензима антиоксидативне заштите и снижење садржаја MDA у изолованим синаптозомима, у којима је претходно изазван оксидативни стрес.

Значајан практични допринос дисертације односи се на резултате добијене применом различитих начина микровинификације, у смислу доприноса дефинисању појединих одредби будућег Правилника о квалитету и другим захтевима за воћна вина. Како је данас је у свету тренд конзумирања функционалне хране, резултати ове докторске дисертације такође доприносе и у том погледу. Са технолошког становишта добијени резултати омогућавају изналажење најоптималнијег начина производње вина, како би се оно у што већој мери садржавало билошки активних једињења, промотивног ефекта по здравље људи.

Д. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ САСТАВНИ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Научни радови:

- Čakar, U., Petrović, A., Pejin, B., Čakar, M., Živković, M., Vajs, V., Đorđević, B., 2019. Fruit as a substrate for a wine: A case study of selected berry and drupe fruit wines. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 244, 42–49. (M21)
- Čakar, U., Grozdanić, N., Pejin, B., Vasić, V., Čakar, M., Petrović, A., Djordjević, B., 2018. Impact of vinification procedure on fruit wine inhibitory activity against α -glucosidase. *Food Biosci.* 25, 1–7. (M21)
- Čakar, U., Grozdanic, N., Petrovic, A., Pejin B., Nastasijevic, B., Markovic, B., Dordevic, B., 2017. Fruit Wines Inhibitory Activity Against α -Glucosidase. *Curr Pharm Biotechnol* 18, 1264–1272. (M22)
- Čakar, U., Petrović, A., Janković, M., Pejin, B., Vajs, V., Čakar, M., Djordjević, B., 2018. Differentiation of wines made from berry and drupe fruits according to their phenolic profiles. *Eur. J. Hortic. Sci.* 83, 49–61. (M23)
- Čakar, U., Petrovic, A., Zivkovic, M., Vajs, V., Milovanovic, M., Zeravik, J., Djordjevic, B., 2016. Phenolic profile of some fruit wines and their antioxidant properties. *Hem. Ind.* 70, 661–672. (M23)

Ћ. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу прегледа и анализе резултата докторске дисертације коју је поднео дипл. фарм. Урош Чакар, као и поређењем прихваћених и остварених циљева истраживања. Комисија пре свега констатује да су успешно обављена сва предвиђена истраживања, а да је дисертација самосталан и оригиналан научни рад. Кандидат дипл. фарм. Урош Чакар је веома успешно реализовао експериментални део рада. Сви резултати истраживања су обрађени и добро приказани у оквиру прегледних, табела и слика које логично прате текст. Анализа и коментари резултата су јасни и прецизни, док посебан квалитет чине обимни подаци других аутора који су добро уклопљени у целину рада тако да се текст веома лако прати и усваја.

Резултати истраживања остварени у оквиру ове докторске дисертације су веома значајни, како за науку тако и за праксу. Овим радом су добијени одговори на нека до сада отворена питања, а стечена су и бројна сазнања која представљају добру основу за наставак истраживања у овој области.

Имајући у виду све наведено, Комисија позитивно оцењује урађену докторску дисертацију дипл. фарм. Уроша Чакара под насловом **„Полифенолни састав и антиоксидативна својства воћних вина и њихов утицај на ензимске системе *in vitro*“** и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати ову позитивну оцену и упути је Већу научних области медицинских наука Универзитета у Београду у циљу добијања сагласности за јавну одбрану.

У Београду 23.01.2020.

Dr sc. Брижита Ђорђевић
ментор, редовни професор
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Dr sc. Александар Петровић
ментор, доцент
Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет

Dr sc. Иван Станковић
редовни професор
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
