

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

Датум: 10.01.2024.
Београд – Земун

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Стефана М. Колашинца, мастер инжењера пољопривреде

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број: 32/22-7.1. од 01.12.2023. године, именована је Комисија за оцену урађене докторске дисертације под насловом: **“Каротеноиди, њихов антиоксидативни капацитет и биолошка активност у одабраним сортама паприке и њиховим традиционалним производима”**, кандидата Стефана М. Колашинца, мастер инжењера пољопривреде.

Комисија у саставу: др Илинка Пећинар, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Драгосав Мутавцић, виши научни сарадник Института за мултидисциплинарна истраживања Универзитета у Београду, др Мирјана Цветковић, научни сарадник Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду, др Ђорђе Моравчевић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Миле Вељовић, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, на основу прегледа, анализе и оцене докторске дисертације подноси Наставно-научном већу Пољопривредног факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ И ДИСЕРТАЦИЈИ

1.1. Општи подаци о кандидату

Стефан Колашинац, маст. инж. пољопривреде, рођен 26. фебруара 1990. године у Београду. Основну и средњу школу завршио је у Београду. На Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, Одсек за ратарство и повртарство је дипломирао 2014. године са просечном оценом 9,56. Награђен је као најбољи студент Одсека за ратарство и повртарство у школској 2013/2014. години. Академски назив Мастер инжењер пољопривреде стекао је 2015. године одбранивши Мастер рад под називом: "Утицај исхране биљака цинком на минерални састав плода и семена парадајза" са оценом 10 (десет). Мастер рад је урађен у оквиру пројекта под називом "Минерални стрес и адаптација биљака на маргиналним пољопривредним земљиштима" (ОИ 173028). Школске 2016/2017. године Стефан Колашинац уписује докторске студије на Пољопривредном факултету. Од 2017. до 2021. године био је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Током докторских студија, положио је све предмете предвиђене програмом са просечном оценом 9,90. Током 2019/20 године, боравио је, у оквиру Ерасмус програма размене студената, на Хемијском факултету Универзитета Јагиелонија у Кракову где је слушао и полагао предмете уско повезане са спектроскопијом и хемометријом (Multivariate analysis in chemistry and Spectroscopic methods for characterization and imaging of

biomaterials). Од школске 2016/17 године, Стефан Колашинац изводи вежбе на предметима Пољопривредна ботаника и Систематика цветница Стефан Колашинац је био учесник билатералне сарадње Србије са СР Немачком под називом "Application of infrared (IR) and Raman spectroscopy for identification and localization of various bioactive substances in various medical and aromatic plants". Учествовао је у реализацији билатералне сарадње између Републике Србије и Кине под називом "Biological effects of extracts and molecules isolated from plants from the Balkans". Од 2017. до 2021. године, Стефан Колашинац је учествовао у реализацији националног пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом "Модерни биотехнолошки приступ решавању проблема суше у пољопривреди Србије" као стипендиста министарства. У периоду од јуна до јула 2021. године, Стефан Колашинац је боравио на стручном усавршавању у Португалији као учесник пројекта Horizon2020 (EthnoHERBS-H2020-MSCA-RISE-2018 project). Од 2020. учесник је пројекта R-SPECT (Novel Raman chemometrics-based approach in food quality assessment: carotenoids as model nutrients for application to functional products) финансираном од стране Фонда за науку Републике Србије. Стефан Колашинац је до сада објавио 40 научних радова, од чега 16 на SCI листи. С. Колашинац је члан Међународне асоцијације за лековито и ароматично биље земаља југоисточне Европе (Association on medicinal and aromatic plants of the southeast european countries – АМАРСЕЕС) као и Међународног друштва за каротеноиде (International Carotenoid Society). Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број 32/8-4.3. од 29.5.2019. године, именована је комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације С. Колашинца под насловом: „Каротеноиди, њихов антиоксидативни капацитет и биолошка активност у одабраним сортама паприке и њиховим традиционалним производима“. Тема докторске дисертације успешно је одбрањена дана 10.6.2019. године а за ментора је одређена др Зора Дајић-Стевановић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

1.2. Општи подаци о дисертацији

Докторска дисертација Стефана М. Колашинца, мастер инжењера пољопривреде, под насловом “Каротеноиди, њихов антиоксидативни капацитет и биолошка активност у одабраним сортама паприке и њиховим традиционалним производима”, написана је у складу са Упуством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду, као и у складу са пријавом теме која је одобрена од стране Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и Већа научних области биотехничких наука Универзитета у Београду. Докторска дисертација садржи: насловне странице на српском и енглеском језику, страницу где су наведени ментори и чланови Комисије, страницу са изјавама захвалности, резиме на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај и текст дисертације организован по поглављима. Дисертација је написана на 153 странице текста (са нумерацијом) и садржи 27 табела и 92 слике. Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља, и то: Увод (стр. 1), Преглед литаратуре (стр. 2-24), Циљеви и хипотезе истраживања (стр. 25), Материјал и методе (стр. 26-38), Резултати и дисутекста (стр. 39-104), Закључци (стр. 105-106), Литература (стр. 107-120), Прилози (стр. 121-147). На крају текста дисертације налазе се Биографија аутора (стр. 148-149), Изјава о ауторству (стр. 150), Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације (стр. 151), Изјава о коришћењу (стр. 152).

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет истраживања ове докторске дисертације обухвата квалитативну и квантитативну анализу доминантних каротеноида као и испитивање антиоксидативног и биолошког капацитета екстракта одабраних генотипова паприке кроз фазе сазревања, као и традиционалног производа од паприке (ајвара). Према томе, први циљ је био да се утврди садржај доминантних каротеноида у екстрактима одабраних сорти свежих паприка у различитим фазама сазревања и у производу, ајвару. Други циљ је био да се утврди антиоксидативни и биолошки потенцијал одабраних генотипова кроз фазе сазревања и у ајвару. Трећи циљ је био да се разлике у каротеноидном саставу искористе у циљу формирања модела за препознавање генотипова паприке као и фазе сазревања паприке.

3. ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ ОД КОЈИХ СЕ ПОЛАЗИЛО У ИСТРАЖИВАЊУ

Основне хипотезе од којих се полазило у оквиру ове докторске дисертације су следеће:

1. Профил каротеноида (састав и количина) у плодовима и традиционалном производу зависиће од генотипа.
2. Састав и количина каротеноида мењаће се током фаза развића плода паприке
3. Постоји разлика у биодоступности каротеноида између паприке у физиолошкој фази сазревања и ајвара
4. Раманова спектроскопија се може користити за квалитативну и квантитативну карактеризацију каротеноида између различитих сорти и током фаза развића, уз примену одговарајућег хемометријског модела
5. Разлике у биолошкој активности између различитих узорака, сорти и њихових производа су у вези са разликама концентрација главних каротеноидних молекула

4. КРАТАК ОПИС САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У овом поглављу набројане су најчешће гајене врсте у оквиру рода *Capsicum* sp. као и морфолошке варијације у оквиру овог рода. Такође, кандидат указује на значај паприке и производа од паприке као извора каротеноида који представљају вредна биоактивна једињења значајна за превентивно лечење многих болести. Кандидат истиче које су највише коришћене врсте паприке у исхрани људи, и значај плодова који се могу користити у свежем стању или прерађени. Наведени су доминантни каротеноиди одабраних генотипова паприке и традиционалног производа од паприке, ајвара. Такође, кандидат наглашава да ће се спровести анализе мерења антиоксидативног капацитета као и биолошке активности у виду инхибиције одређених ензима и *in vitro* дигестије. Очекује се да метода Раманове спектроскопије омогући квантификацију укупних каротеноида који ће бити у корелацији са резултатима добијеним НРТЛС методом и спектрофотометријски. Очекује се да ће резултати добијени Рамановом спектроскопијом бити коришћене и за прављење модела за препознавање сорте паприке као и фазе сазревања паприке.

Преглед литературе. Ово поглавље се састоји од 14 потпоглавља у којима су доступни литературни подаци повезани са предметом проучавања докторске дисертације. У првом потпоглављу под називом *Порекло и историјат паприке* кандидат представља опште историјске податке везане за паприку. У следећем потпоглављу под називом *Систематски положај гајених врста рода Capsicum L.* кандидат је представио таксономски положај овог рода. У потпоглављу *Производња*

паприке у свету и код нас кандидат наводи највеће светске произвођаче паприке као и најчешће гајене сорте. У наредном потпоглављу под називом *Ботаничке особине паприке (Capsicum annuum L.)* описане су опште морфолошке особине вегетативних и репродуктивних органа паприке (корен, стабло, лист, плод, семе) као и анатомска грађа попречног пресека плода паприке. У петом потпоглављу *Производња паприке* кандидат је приказао термине сетве, расађивања и бербе паприке у зависности да ли је у питању рана, средње-рана или касна производња паприке. У потпоглављу *Производи од паприке* наводе се начини на које се плод паприке може користити и који су најпопуларнији производи од паприке у Медитерану, западној Азији, Африци, као и Мађарској и Србији. У потпоглављу *Нутритивна вредност и хемијски састав плода паприке* приказана је нутритивна вредност и хемијски састав зелене, црвене и жуте паприке. У потпоглављу *Врсте каротеноида у биљкама* кандидат је објаснио општу грађу молекула каротеноида, њихову поделу на каротене и ксантофиле. Ово потпоглавље се састоји од пет подналова: *Биосинтеза каротеноида, Биљке богате каротеноидима, Улога каротеноида у фотосинтези и антиоксидативна активност, Каротеноиди и адаптације биљака на услове стреса, Остале улоге каротеноида у биљкама.* У наведеним поднасловима кандидат је описао цео биосинтетски пут каротеноида укључујући кључне тачке биосинтезе које воде до формирања првих каротеноида. Затим је направљен преглед биљака богатих каротеноидима као и њихови доминантни каротеноиди. Потом су наведене улоге каротеноида у фотосинтези где као помоћни молекули сакупљају одређену количину фотона и преносе их до хлорофила. Наведена је и антиоксидативна и фотопротективна улога каротеноида у биљкама као и допринос одговора биљака у условима стреса. На крају овог потпоглавља наведене су остале улоге каротеноида у биљкама као што су одговор на ефекте патогена и остваривању симбиотских односа. Потпоглавље *Биорасположивост и биолошки ефекти каротеноида* садржи и два подналова, *Биорасположивост каротеноида и Биоактивност каротеноида и њихов значај за здравље људи.* У оквиру првог подналова предочени су сви фактори од којих зависи биодоступност каротеноида укључујући матрикс у ком се каротеноиди налазе, рН вредност, температура, светлост, термичка обрада, присуство липида и друго. Такође, кандидат је објаснио појмове биодоступности и биорасположивости. У оквиру подналова *Биоактивност каротеноида и њихов значај за здравље људи* кандидат је навео све предности ових биоактивних молекула у погледу функционисања људског организма као и смањењу ризика од великог броја болести. Посебно је апострофирана улога каротеноида у инхибицији ензима α -амилаза и тирозиназа. У потпоглављу *Индустријска примена каротеноида и глобално тржиште* кандидат је објаснио да је потражња за каротеноидима у сталном порасту што последично доводи до повећања глобалног тржишта каротеноида. У потпоглављу број 11 под називом *Каротеноиди присутни у врстама рода Capsicum L.* кандидат је навео који су најдоминантнији као и мање приступни каротеноиди. У потпоглављу *Изолација и карактеризација каротеноида* наведени су кључни кораци приликом анализе каротеноида као што су узорковање, екстракција, сапонификација, концентровање, хроматографска сепарација, идентификација, квантификација и интерпретација резултата. Такође, кандидат је набројао најчешће коришћене аналитичке методе за детекцију и квантификацију каротеноида, као што су НРТЛС, НПЛС, NMR и друге. У претпоследњем потпоглављу под називом *Раманова спектроскопија у анализи каротеноида* кандидат је уопштено описао принцип рада методе и навео њене предности у анализи каротеноида као и кључне траке за карактеризацију ових једињења. У последњем потпоглављу под називом *Хемометријска анализа Раманових спектра* представљен је значај и важност хемометријске обраде Раманових спектра биолошких узорака и наведене су поједине

методе за редукцију броја варијабли (као што су PCA, NMF, BFE), за класификацију објеката (PLS-DA, SIMCA, SVM) као и за квантификацију (MLR, PLSR, SVMR). **Материјал и методе.** Ово поглавље је подељено у 10 потпоглавља. Одређена потпоглавља садрже мањи број поднаслова. У првом потпоглављу *Биљни материјал коришћен у експерименту* кандидат је навео да су одабрани генотипови прикупљени са огледног поља Института за ратарство и повртарство осим сорте Вртка која је узоркована са производног поља у Белој Паланци. Кандидат је описао морфолошке особине плодова свих генотипова коришћених у експерименту. Такође, кандидат наводи датуме сетве, датуме расађивања као и време брања плодова. Описани су сви генотипови који су коришћени у анализама. У овом потпоглављу кандидат наводи и рецептуру за справљање ајвара. Сви узорци су одмах након брања очишћени, исецкани, замрзнути и лиофилизовани. У другом потпоглављу *Мерење масе, морфолошких параметара плодова паприке и количине шећера* обухвата мерење основних морфолошких параметара плода паприке (маса, дужина плода, ширина плода, дебљина перикарпа) као и брикс. У потпоглављу *Екстракција каротеноида* описан је поступак екстракције каротеноида из лиофилизата анализираних паприка и ајвара. Поступак је обухватио екстракцију 0,5 g лиофилизата смешом растварача ацетона и хексана у односу 1:1 запремине 3 ml на ултразвучном купатилу у трајању од 15 минута након чега се приступило центрифугирању у трајању од 5 минута на 13500 обртаја у минути. Супернатант је коришћен за даље анализе. Четврто потпоглавље под називом *Анализа каротеноида HPTLC методом* обухватило је 2 поднаслова (*Квалитативно и квантитативно одређивање каротеноида HPTLC методом* и *Хеометријска обрада слика хроматограма*). Ово потпоглавље је обухватило припрему серије стандарда каротеноида за формирање калибрационе криве која ће служити за квалитативну и квантитативну анализу испитиваних каротеноида. Добијени екстракти из претходног потпоглавља као и серије стандарда су анализирани техником хоризонталне танкослојне хроматографије (HPTLC). Поднаслов *Хеометријска обрада слика хроматограма* садржи поступке обраде хроматографских плоча након раздвојених каротеноидних трака који су обухватили фотографисање плоча, а затим уз помоћ софтвера ImageJ добијена фотографија је раздвојена на 3 канала (црвени, зелени и плави), али је за даље анализе коришћен само плави канал јер је у њему одзив каротеноидних трака био најбољи. Даљи поступци анализе овако добијених података обухватили су формирање модела за препознавање генотипа паприке као и фазе сазревања паприке. Следеће потпоглавље под називом *Одређивање биоактивних компоненти из екстракта паприке и производа паприке (ајвара)* обухвата 3 поднаслова: *Одређивање укупних полифенола*, *Одређивање укупних каротеноида*, *Одређивање укупних флавоноида*. У оквиру овог потпоглавља и поднаслова, детаљно су описане спектрофотометријске методе за одређивање биоактивних компоненти у екстрактима паприке и ајвара. Следеће потпоглавље под називом *Одређивање антиоксидативне активности екстракта паприке и производа од паприке (ајвара)* обухвата 3 поднаслова: *Одређивање способности сакупљања DPPH• радикала*, *Способност редукције Fe³⁺ - FRP* и *Одређивање Купри јон редукуюће антиоксидативне моћи – CUPRAC*). У оквиру овог потпоглавља и поднаслова, детаљно су описане спектрофотометријске методе за одређивање биоактивних компоненти у екстрактима паприке и ајвара. У потпоглављу број 7 под називом *Статичка in vitro гастроинтестинална дигестија каротеноида*, коришћен је опште прихваћен стандардизовани статички *in vitro* протокол дигестије - INFOGEST протокол, за процену биодоступности каротенидних једињења из екстракта свежег плода и ајвара сорте Уна. У потпоглављу број 8 под називом *Биоактивност екстракта различитих сорти паприка и ајвара* обухваћена су два поднаслова:

Инхибиција ензима α -амилазе и Инхибиција ензима тирозиназе. У овом потпоглављу и поднаслову детаљно су приказане спектрофотометријске методе за одређивање инхибиције ова два ензима у присуству метанолних екстраката плодова паприке у физиолошкој фази сазревања као и метанолних екстраката ајвара истих сорти. У потпоглављу *Анализа каротеноида Рамановом спектроскопијом* у оквиру ког су 3 поднаслова детаљно су описани инструменти који су коришћени за утврђивање степена зрелости паприке као и за одређивање сорте паприке у пуној физиолошкој зрелости и квантификацију каротеноида. За ову анализу коришћени су Раманови спектроскопи: Horiba Jobin Yvon (Palaiseau, France) са Olympus BX 41 микроскопом (Olympus, Tokyo, Japan), који користи LabSpec 6.0 softver и Witec Alpha 300R (Germany) опремљен конфокалним Zeiss микроскопом (Zeiss, Germany) на таласној дужини 532 nm. У оквиру првог поднаслова под називом *Примена хеометријског дискриминационог модела у циљу препознавања фазе зрења црвене паприке* свежи узорци паприке снимани су Рамановим спектрометром а резултати су подвргнути детаљној хеометријској обради чији је резултат модел за препознавање фазе зрења паприке. У ову сврху одабрана је сорта Куртовска капија као модел сорта које је у великој мери присутна на тржишту наше земље. У оквиру поднаслова *Примена резултата Раманове спектроскопије у развијању хеометријског дискриминационог модела у циљу препознавања генотипова паприке у фази пуне зрелости* снимани су спектри свежих плодова паприке свих испитиваних генотипова у финалној фази зрења. Добијени резултати су хеометријски детаљно обрађени а као резултат добијен је класификациони модел за препознавање генотипа паприке. У оквиру поднаслова *Примена Раманове спектроскопије за квантификацију укупних каротеноида у фази пуне зрелости* описан је начин на који су снимани спектри екстраката паприке и ајвара сорти Куртовска капија и Уна као и серије стандардних раствора β -каротена. Коришћени су идентични екстракти који су коришћени за анализу каротеноида НРТЛС методом. Такође је описано да су након снимања, спектри хеометријски обрађени у циљу формирања квантификационог модела. Последње потпоглавље, *Софтверски пакети коришћени приликом статистичке обраде података* обухвата навођење софтвера у одређеним деловима ове докторске дисертације користили, као што су: (SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL), Unscrambler (The Unscrambler X version 10.4 (Camo Software, Oslo, Norway) и XLSTAT (version 2014, Addinsoft).

Резултати и дискусија. Резултати истраживања приказани су јасно и прегледно кроз слике, табеле и текстуалну анализу, уз јасну и концизну дискусију и поређења са резултатима других истраживања. Ово поглавље се састоји од 5 потпоглавља при чему већина садржи поднаслове. Прво потпоглавље, *Анализа основних морфолошких параметара плода паприке у фази физиолошке зрелости* кандидат је описао резултате испитиваних мерених параметара. Највеће просечне вредности за масу плода (145,07 cm), дужину плода (14,52 cm), ширину плода (7,18 cm) и дебљину перикарпа (5,27 cm) забележене су код сорте Амфора док је код исте сорте забележена најнижа вредност брикса (6,34). Са друге стране, код сорте Вртка су забележене статистички значајно најниже вредности за поменуте параметре осим за вредност брикса која је била највиша и износила је 9,40. Маса плода била је у позитивној корелацији са дужином плода, ширином плода и дебљом перикарпа што је и очекивано с обзиром да са растом дужине, ширине плода као и дебљине перикарпа расте и маса плода. Са друге стране, маса плода је у негативној корелацији са вредностима брикса. У оквиру другог потпоглавља, *Квалитативна и квантитативна анализа каротеноида екстраката паприке и ајвара НРТЛС методом* приказани су резултати квалитативне и квантитативне анализе. Резултати су показали да количина и састав каротеноида зависе од сорте. Резултати НРТЛС анализе показали су да капсантин углавном код сорти

Амфора и Вртка почиње да се детектује од фазе 3 а да му је максимална концентрација у финалној фази сазревања (фаза 5). Количина капсантина креће су у опсегу од 0,0708 g/100g (код сорте Амфора у фази 3) до 0,5097 g/100g (код сорте Вртка у фази 5). Његова количина се смањује у ајвару у свим испитваним сортама. Када је у питању лутеин/зеаксантин, резултати показују углавном тренд раста и највећу концентрацију у финалној фази сазревања (фаза 5). Количина лутеина/зеаксантина креће су опсегу од 0,0152 g/100g (код сорте Уна у фази 1) до 1,624 g/100g (код сорте Вртка у фази 5). Количина лутеина/зеаксантина је мања у ајвару у свим испитваним сортама у односу на вредности забележене у фази 5. Резултати испитивања количине β -криптоксантина показали су да се овај каротеноид први пут детектује у фази 5 код свих испитваних генотипова. Количина овог каротеноида креће се у опсегу од 0,0129 g/100g (код сорте Уна) до 0,0811 (код сорте Вртка). Количина β -криптоксантина у ајвару се смањује у односу на фазу 5, код свих испитваних генотипова. Количина β -каротена расте са сазревањем и највећа количина је у последњој фази (фаза 5). Резултати показују да се количина овог каротеноида креће у опсегу од 0,09 g/100g (код сорте Куртовска капија у фази 1) до 0,9912 g/100g (код сорте Куртовска капија у фази 5). Количина овог каротеноида у ајвару код свих испитваних сорти опада у односу на вредности забележене у фази 5. Треба напоменути да је процентуално смањење количине укупних испитваних каротеноида у традиционалном производу (ајвару) у односу на фазу 5 најмање код сорте Куртовска капија (1,9 %), Вртка (16,28 %) и Амфора (19,53 %) док је највеће смањење забележено код сорте Уна (66,98 %). Ови резултати указују на то да ајвар треба справљати од сорте Куртовска капија како би се сачувала значајна количина ових вредних биоактивних једињења. Овде такође треба напоменути да је процентуално смањење укупних каротеноида у ајвару у односу на фазу 5 у веома јакој индиректној (негативној) корелацији са количином β -каротена у фази 5 ($r=0,9536$, $r^2=0,9094$). Прецизније, сорте које су имале већи садржај β -каротена у фази 5 имале су мањи пад укупних каротеноида у ајвару. Наиме, β -каротен је липофилно једињење које се раствара у уљу при чему се β -каротен вероватно енкапсулира унутар уљане капљице. Уљана капљица представља баријеру која β -каротен физички одваја од спољашње средине укључујући и директан контакт са високом температуром. Заправо, уљана капљица апсорбује и дистрибуира топлоту равномерно чиме спречава директно локално деловање топлоте. Поред тога, овај начин штити β -каротен и од деструктивног деловања кисеоника (Gheonea i sar., 2020; Qiu i sar., 2012). Са друге стране, интересантно је запажање да је најмањи губитак каротеноида у процесу справљања ајвара запажен код сорте Куртовска капија где је биосинтеза свих појединачних каротеноида почела најраније и која је имала далеко највеће вредности количине β -каротена као и укупних каротеноида. Код ове сорте губитак укупних каротеноида (посебно β -каротена) био је минималан. Са друге стране, код сорте Уна касније почиње биосинтеза свих каротеноида (детектовани су тек у фази 3) и показује најмању количину β -каротена и укупних каротеноида у фази пуне зрелости плода. Далеко највећи губитак укупних и појединачних каротеноида запажен је управо код ове сорте. Могуће је да укупни састав каротеноида, посебно у односу на β -каротен који је релативно стабилан, њихова динамика биосинтезе и капацитет акумулације, свеукупно утичу на очување каротеноида у току термичке обраде. На основу информација које су добијене обрадом хроматографских плоча у софтверу ImageJ, формиран су модели за препознавање сорте и фазе сазревања паприке. Резултати су показали да PCA-LDA модел показује најбоље перформансе у погледу класификовања како паприка у различитим фазама сазревања тако и испитваних генотипова између себе. Према конфузионој матрици, ниједан генотип није у потпуности тачно класификован, тачно је класификовано 85% узорака. У оквиру трећег потпоглавља, *Одређивање садржаја*

укупних испитиваних биоактивних компоненти, приказани су резултати укупних каротеноида, полифенола и флавоноида. Највећа количина укупних каротеноида забележена је у фази пуне зрелости код свих испитиваних генотипова, а највишом вредности код генотипа Вртка (1502,21 mg/100g) и Куртовска капија (1498,21±60,89 mg/100g). Најмања количина укупних каротеноида забележена је почетној фази сазревања а најнижа вредности уочена је код генотипа Уна (20,22 mg/100g). Применом методе Анализе варијансе показано је да разлика у количини укупних каротеноида између треће и пете фазе статистички значајна код свих генотипова. Такође, количина укупних каротеноида у ајвару у односу на фазу пуне зрелости је статистички значајно мања код свих испитиваних генотипова. Када су у питању укупни флавоноиди, њихова количина опада са сазревањем, док у ајвару код неких генотипова расте док код неких опада (од 2,18 % код Куртовске капије до 9,94 % код Амфоре) у односу на последњу фазу сазревања. Резултати анализе укупних полифенола показали су тренд пада са сазревањем. Највећа количина укупних полифенола у физиолошкој фази зрелости забележена је код генотипа Уна (12,22 mg/g GAE), док је најмања вредност забележена код генотипа Вртка (7,58 mg/g GAE). Код сорти Амфора и Вртка количина укупних полифенола је повећана у ајвару у односу на фазу физиолошке зрелости, док је код генотипова Куртовска капија и Уна обрнут случај. Четврто потпоглавље, *Антиоксидативни капацитет екстракта паприке и ајвара*, показује да антиоксидативна активност расте са сазревањем код свих испитиваних генотипова и код свих тестираних метода за мерење антиоксидативности. Такође, код свих генотипова, антиоксидативна активност екстракта ајвара благо опада у односу на последњу фазу сазревања. Највећа способност хватања DPPH[•] радикала забележен је код генотипа Куртовска капија (1,50 μmol еквивалента TEAC/g SM) а најмања вредност је забележена код генотипа Уна (1,18 μmol еквивалента TEAC /g SM) што је у складу са резултатима HPTLC методе и методе укупних каротеноида. Највећи процентуални пад инхибиције DPPH радикала у односу на фазу пуне зрелости, забележен је код сорте Вртка (16,03 %), а најмањи код сорте Уна (6,78 %). Такође, CUPRAC теста су у позитивној корелацији са резултатима DPPH теста. Наредно потпоглавље, *Биорасположивост и биолошки ефекти каротеноида*, садрже 2 поднаслова, *Биодоступност каротеноида из плода паприке и ајвара сорте Уна* и *Биоактивност екстракта каротеноида из различитих сорти паприка и ајвара*. У оквиру ових поднаслова кандидат објашњава биодоступност каротеноида из различитих матрикса (кроз фазе сазревања и у ајвару). Показано је да је биодоступност каротеноида у ајвару повећана у односу на све остале фазе сазревања, разлог томе може бити инкапсулираност каротеноида у уљаној капљици у ајвару а додатну заштиту омогућили су жучне соли из гастричне фазе и глицерол који заједно окружују молекуле каротеноида и на тај начин спречавају деградацију. Показани су резултати инхибиције ензима α-амилазе и тирозиназе. Кандидат је такође објаснио да екстракти свежих паприка показују већу инхибиторну активност у односу на екстракте ајвара. Такође је показано да постоји статистички значајна негативна корелација између IC50 вредности за ензим тирозиназа и биоактивних једињења из метанолних екстракта паприке и ајвара. Пето потпоглавље, *Анализа каротеноида Рамановом спектроскопијом* садржи и неколико поднаслова. У оквиру поднаслова *Хеометријски модели у обради Раманових спектра у циљу препознавања фазе зрења паприке* резултати су показали да Раманова спектроскопија може да детектује каротеноиде, али и неке друге молекуле (липиде, фенолна једињења, кутикуларне восакове) што је заједно допринело једној свеопштој информацији о узорку. Резултати примене таквих информација (спектра) у дискриминацији (препознавању) фаза зрења показали су да модел SIMCA пружа највећу поузданост (100 %). У оквиру поднаслова *Примена*

Раманове спектроскопије у развијању хеометријског дискриминационог модела у циљу препознавања сорте паприке у финалној (физиолошкој) фази зрења, показани су резултати препознавања генотипа паприке на основу информација добијених Рамановом спектроскопијом. Спектри су претходно обрађени на неколико различитих начина и резултати су показали да модел PCA-QDA даје најпоузданије резултате класификације (90,89 %). У оквиру поднаслови *Квантитативна анализа укупних каротеноида у плоду паприке применом Раманове спектроскопије* показано је да Раманова спектроскопија може да квантификује укупне каротеноиде са одређеним одступањем у односу на контролну методу (HPTLC).

Закључци. На основу добијених резултата и њихове дискусије правилно су изведени закључци који у потпуности произилазе из добијених резултата. Кандидат је на основу резултата добијених истраживања закључио да сорте Куртовска капија (1,5527 g/100g SM) и Вртка (1,4752 g/100g SM) поседују највећу а сорта Уна најмању количину укупних испитиваних каротеноида (0,3792 g/100g SM) (β -каротен+ β -криптоксантин+капсантин+лутеин/зеаксантин) применом HPTLC методе. Сорта Куртовска капија садржи највећу количину капсантина и β -каротена, док је генотип Вртка богата у β -криптоксантину и лутеину/зеаксантину. Кандидат указује да биосинтеза каротеноида код свих сорти, осим код сорте Уна, почиње у раним фазама растења и развића што доводи до повећане акумулације испитиваних каротеноида, а пре свега β -каротена током сазревања плода. Као резултат ове касне акумулације каротеноида код сорте Уна, количина испитиваних каротеноида је значајније мања и осетније опада у ајвару у односу на фазу пуне зрелости. Кандидат закључује да уљани матрикс доприноси бољој стабилности каротеноида, посебно β -каротена и капсантина у ајвару. Резултати укупних каротеноида показали су раст ових биоактивних једињања са сазревањем, док су резултати укупних полифенола и флавоноида показали обрнут тренд. Количина укупних каротеноида у екстрактима плода паприка у фази пуне зрелости кретала се у опсегу од $289,57 \pm 14,58$ mg/100 g код сорте Уна до $1502,21 \pm 70,74$ mg/100 g код сорте Вртка. Највећи процентуални пад каротеноида у ајвару у односу на фазу пуне зрелости забележен је код сорте Уна (смањење за 82,36 %), а најмањи пад је забележен код сорте Куртовска капија (смањење за 6,48 %). Антиоксидативни капацитет екстракта испитиваних генотипова паприке био је директно зависан од количине укупних каротеноида, чиме је потврђен њихов биолошки смисао као нутријената са виским капацитетом неутрализације слободних кисеоничних радикала. У условима симулиране *in vitro* дигестије екстракти сорте Уна у различитим фазама сазревања показала су различиту биодоступност. Највећа биодоступност забележена је у ајвару, вероватно због његове „инкапсулације“ у уљаним капљицама, као и додатним окруживањем жучним солима и глицеролом који су омогућили заштиту каротеноида од даље деградације. Резултати инхибиторне активност ензима алфа амилазе и тирозиназе показали су да екстракти свежих паприка показују бољу инхибиторну активност од екстракта ајвара у свим испитиваним сортама, сходно очекиваној трансформацији и деградацији главних група секундарних метаболита (полифенола, флавоноида и каротеноида) услед термичке обраде. Анализом резултата добијених применом Раманове спектроскопије у комбинацији са хеометријом закључено је да се овом методом може одредити и степен зрелости паприка као и сортог порекла паприке. Кандидат је потврдио да најбољу класификациону моћ за одређивање фазе зрења има модел SIMCA. А најбољи модел за одређивање сорте паприке је QDA. Кандидат је тиме закључио да Раманова спектроскопија може користити у квантификацији укупних каротеноида применом модела Мултиваријантне линеарне регресије. Кандидат у свом завршном закључку указује да би будућа истраживања требало усмерити ка раздвајању каротеноида из смеше и симултаном квантификацији

већег броја доминантних каротеноида из узорка. Поред тога, потребно је обезбедити поновљивост модела његовим тренирањем где би он из нових података био у могућности да континуирано побољшава постојећи модел.

Литература. У овом поглављу кандидат је навео укупно 188 литературних једница, које представљају селекцију најважнијих, претежно новијих међународних референци из области анализе каротеноида заступљених у плодовима паприке.

Прилози. Ово поглавље садржи два потпоглавља *Табеле* и *Слике*. Прво потпоглавље овог поглавља садржи табелу резултата једнофакторске анализе варијансе утицаја сорте (линије) на испитиване морфолошке параметре и брикс. У другом потпоглављу приказане су фотографије хроматографских плоча обрађених софтвером ImageJ као и фотографије плоча пре обраде. Поред тога, у истом поглављу су приказани графици класификације узорака паприке према сазревања и према сортној припадности.

5. ОСТВАРЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ДИСЕРТАЦИЈЕ

Реализацијом ове докторске дисертације детаљно је окарактерисан каротеноидни састав и њихова количина у плодовима неколико генотипова паприке током развића, као и у њиховом производу (ајвару), применом стандардних аналитичких метода (HPTLC) и метода одређивања укупних каротеноида спектрофотометријски, уз иновативну примену неинвазивне, непрепаративне и брзе методе - Раманове спектроскопије. Дисертација укључује формулацију најбољих хеометријских метода за детаљну карактеризацију типова каротеноида и њихове промене током онтогенезе плода, као и разлика у саставу и количини најзаступљенијих каротеноида дејством термичке обраде током справљања традиционалног производа. Допринос ове дисертације огледа се и у разумевању разлика које постоје у биодоступности каротеноида у физиолошкој фази пуне зрелости, као и одговарајућим производима. Резултати Раманове спектроскопије коришћени за развијање хеометријских модела могу са високом сигурношћу идентификовати генотип паприке, као и фазу сазревања плода, а са солидном прецизношћу могу да квантификују укупну количину ових нутријената у различитим узорцима. Поред великог научног доприноса, спроведена истраживања ће имати и практичан значај, утолико што овако постављени модели могу да послуже у анализи различитих примарних и секундарних метаболита у комплексним системима као што су биљне сировине, храна и прехранбени производи.

6. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ

У сарадњи са другим ауторима кандидат је написао четири научна рада који су садржински повезани са предметом ове дисертације и који су објављени у међународним научним часописима који се налазе на SCI листи. Радови су наведени у ПРИЛОГУ.

7. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу анализе докторске дисертације под насловом: **"Каротеноиди, њихов антиоксидативни капацитет и биолошка активност у одабраним сортама паприке и њиховим традиционалним производима"**, кандидата Стефана М. Колашинца, мастер инжењера пољопривреде, Комисија сматра да је дисертација урађена према одобреној Пријави теме и да представља оригинално и самостално научно дело. Кандидат је проучио доступне литературне изворе, који су били коришћени приликом дефинисања циља, предмета и програма истраживања. Примењене методе су

савремене и поуздане. Добијени резултати су прегледно приказани, правилно анализирани и упоређени са резултатима других аутора. Из добијених резултата су правилно изведени закључци. Комисија сматра да је одабрана тема изузетно актуелна, посебно са аспекта примене Раманове спектроскопије и развијања одговарајућих хеометријских модела за дискриминацију (класификацију) плодова одабраних генотипова паприке, као и препознавања сукцесивних фаза током сазревања плодова, на основу детерминације највише заступљених каротеноида (β -каротен, β -криптоксантин). Раманова спектроскопија у комбинацији са хеометријом је у овим истраживањима показала свој потенцијал у квантификацији укупних каротеноида у различитим узорцима, што је, колико нам је познато, прва примена ових метода на подручју југоисточне Европе у области хране и пољопривреде. Поред научног значаја, очекујемо да ће резултати ове дисертације имати и велику апликативну примену, посебно у области контроле квалитета хране и прехранбених производа. Очекујемо да ће даље публикавање резултата ове докторске дисертације изазвати пажњу научне и стручне јавности, посебно у вези са резултатима о високој биодоступности традиционалног производа – ајвара која се заснива на феномену инкапсулације биолошки вредних једињења каротеноида у уљаним мицелама.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да позитивно оцени и прихвати овај Извештај, заједно са поднетом дисертацијом кандидата Стефана М. Колашинца, мастер инжењера пољопривреде, под насловом: **"Каротеноиди, њихов антиоксидативни капацитет и биолошка активност у одабраним сортама паприке и њиховим традиционалним производима"** и да након завршетка процедуре омогући кандидату јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

Београд-Земун

Датум: 10.01.2024. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Илинка Пећинар, ванредни професор, председник
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет
ужа научна област: Пољопривредна ботаника

др Драгосав Мутавцић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за мултидисциплинарна истраживања
ужа научна дисциплина: Хеометрија

др Мирјана Цветковић, научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију – Институт
од националног значаја за Републику Србију
ужа научна дисциплина: Органска хемија

др Ђорђе Моравчевић, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет
ужа научна област: Ратарство, повртарство, цвећарство, крмно и лековито биље

др Миле Вељовић, доцент
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет
ужа научна област: Наука о конзервасању и врењу

ПРИЛОГ

1. **Kolašinac, M.S.**, Pećinar, I., Danojević, D., Dajić-Stevanović, Z. (2022): Raman spectroscopy coupled with chemometric modeling approaches for authentication of different paprika varieties at physiological maturity. *LWT*, 162 (1), 113402. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113402>
2. **Kolašinac, M.S.**, Pećinar, I., Danojević, D., Ačić, S., Dajić-Stevanović, Z. (2021): Raman spectroscopic based chemometric modeling in assessment of red pepper ripening phases and carotenoids accumulation. *Journal of Raman spectroscopy*, 1-8. <https://doi.org/10.1002/jrs.6197>
3. **Kolašinac, M.S.**, Dajić-Stevanović, P. Z., Kilibarda, N.S., Kostić, Ž. A. (2021): Carotenoids: new insights applications of into “Old” pigments. *Phyton*. 90 (4). 1041-1062. 10.32604/phyton.2021.015996
4. Milivojevic, M., Popovic, A., Pajic-Lijakovic, I., Sostaric, I., **Kolasinac, S.**, Dajic-Stevanovic, Z. (2023): Alginate Gel-Based Carriers for Encapsulation of Carotenoids: On Challenges and Applications. *Gels* 9(8), 620; <https://doi.org/10.3390/gels9080620>

**ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације под насловом **“Каротеноиди, њихов антиоксидативни капацитет и биолошка активност у одабраним сортама паприке и њиховим традиционалним производима”**, кандидата Стефана М. Колашинца, мастер инжењера пољопривреде, констатујемо да утврђено подударане текста износи 10%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, посебно из публикованог рада са SCI листе, који је обавезан за оцену и одбрану докторске дисертације и који мора бити из истраживања обухваћених докторском дисертацијом, што је у складу са чланом 9. Правилника.

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

У Београду, 10.01.2024.

Ментор

др Зора Дајић-Стевновић, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет
ужа научна област: Пољопривредна ботаника