

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Мине М. Волић**

Одлуком бр. 35/245 од 03.09.2020. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Мине М. Волић, мастер инжењера технологије, под насловом

„Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља“

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

- **27.02.2019.** Кандидат Мина М. Волић, мастер инжењер технологије, пријавила је тему за докторску дисертацију под називом „Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља“.
- **07.03.2019.** На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, одлуком бр. 35/85 именована је Комисија за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације.
- **11.04.2019.** На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, одлуком бр. 35/148, усвојен је извештај Комисије за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације. За ментора је именован др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду.
- **22.04.2019.** Одлуком бр. 61206-1846/2-19, Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду даје сагласност на предлог теме докторске дисертације Мине М. Волић, мастер инжењера технологије, под називом: „Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља“.
- **03.09.2020.** На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, одлуком бр. 35/245 донета је одлука о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Мине М. Волић, мастер инжењера технологије, под називом: „Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља“.

Кандидат Мина М. Волић је уписала докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско

инжењерство и биотехнологија, школске 2012/2013. године. Решењем бр. 20/155 од 28.09.2018. кандидату је одобрено продужење рока за завршетак докторских студија до краја школске 2020/2021. године.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду. Ментор је др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду чија је компетенција за вођење докторске дисертације потврђена на основу искуства и објављених публикација из области којој дисертација припада.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Мина М. Волић, мастер инжењер технологије, рођена је 17.06.1988. године у Чачку. Основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на студијском програму Хемијско инжењерство, студијско подручје Фармацеутско инжењерство, уписала је школске 2007/2008. године и дипломирала 2011. године са просечном оценом 8,49. Мастер академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је 2011/2012. године на студијском програму Хемијско инжењерство, а завршила 2012. године са просечном оценом 9,63. У току мастер студија била је на стручном усавршавању у Швајцарској (компанија BussChemTech AG, Pratteln). Школске 2012/13. године уписала је докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, одсек за Биохемијско инжењерство и биотехнологију, под менторством проф. др Бранка Бугарског. Положила је све програмом предвиђене испите и одбранила завршни рад на тему „Микро и нано емулзиони системи за контролисано отпуштање биолошки активних супстанци“ са оценом 10.

Од априла 2015. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета, у оквиру пројекта интегрисаних и интердисциплинарних истраживања у пољопривреди и храни: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за биокатализаторе и биолошки активне компоненте хране и безбедност“, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ИИИ46010). Звање истраживач сарадник стекла је 29. августа 2019. године. Учествовала је у реализацији два иновативна пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја: „Производња нових дијететских формулација на бази природних протеина са антиоксидативним и анти туморским ефектима“ и „Капсуле здравља у леденом чају“. У периоду 01.04. - 01.07.2016. године била је учесник Ерасмус + програма, у сарадњи са Пољопривредним универзитетом у Атини (Higher Education – KA107 International Mobility). Такође је учествовала у Билатералном пројекту између Србије и Хрватске под називом „Инкапсулација екстракта матичњака (*Melisa officinalis*) и траве ива (*Teucrium montanum*) у емулзије и липозоме с циљем добијања функционалних додатака прехране“ (2019/2020). Члан је IFT-a (Institute of Food Technologists).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Мине М. Волић, мастер инжењера технологије, под називом „Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља“ садржи 120 страна (од којих је 109 страна нумерисано), у оквиру којих се налазе 44 слике, 12 табела и 242 литературна навода. Докторска дисертација садржи 7 целина: Увод, Циљ рада,

Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику, а биографија кандидата је дата на крају. По свом облику и садржају, поднети рад задовољава све стандарде за докторску дисертацију Универзитета у Београду.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У Уводном делу дата је полазна основа истраживања и истакнут је значај употребе етарских уља. Поред тога, дат је приказ проблематике која је обрађена у докторској дисертацији. Наглашена је потреба за инкапсулацијом етарских уља у циљу њихове заштите, применом природних полимерних материјала као носача за инкапсулацију.

Теоријски део се састоји из три поглавља: Етарска уља, Инкапсулација и Примена система са инкапсулираним етарским уљима.

У оквиру поглавља под називом Етарска уља (Поглавље 1) налазе се три потпоглавља: у првом је описано етарско уље тимијана (*Thymus vulgaris* L.), у другом потпоглављу дат је приказ састава етарских уља и у трећем је приказана биолошка активност етарских уља. У оквиру поглавља Инкапсулација (Поглавље 2) описан је циљ инкапсулације и у оквиру истог налазе се два потпоглавља: Технике за инкапсулацију етарских уља, у којем су детаљније описане технике емулзификације и екструзионе технике, а дат је и осврт на стабилност емулзија и Полимерни материјали за инкапсулацију етарских уља, са посебним акцентом на алгинат, карактеристике алгинатних хидрогелова, протеине, алгинат-протеин системе за инкапсулацију, лецитин, као и протеин-лецитин интеракције. У оквиру поглавља Примена система са инкапсулираним етарским уљима (Поглавље 3) дат је приказ досадашњих достигнућа на пољу инкапсулације етарских уља и примене добијених система у биотехнологији, пољопривреди и фармацији.

У Експерименталном делу (Поглавље 4) описани су материјали и методе, према редоследу експерименталног истраживачког рада. Најпре су приказане методе за одређивање садржаја етарског уља. Затим, приказан је поступак формулисања емулзија и састав различитих формулација, као и методе карактеризације које се односе на испитивање стабилности и реолошких карактеристика емулзија и испитивање интеракција између компонената у емулзији и на граници фаза. Након тога, детаљно је описана припрема хидрогел система на бази алгината и протеина са инкапсулираним етарским уљем, применом технике електростатичке екструзије. У наставку, дат је преглед метода карактеризације добијених хидрогелова, као што су гравиметријско одређивање бубрења хидрогелова у симулираним гастро-интестиналним условима, оптичка и скенирајућа електронска микроскопија, одређивање реолошких својстава носача у симулираним гастро-интестиналним условима, као и испитивање механичких и термичких карактеристика хидрогел система. Описане су методе којима се испитују могуће интеракције између компонената носача и/или носач-етарско уље. Такође, приказане су методе за одређивање ефикасности инкапсулације етарског уља, а затим и методе за одређивање антиоксидативног и антимикубног капацитета инкапсулираног етарског уља у хидрогелове на бази алгината и протеина соје. Дат је опис метода за испитивање потенцијалне примене добијених хидрогелова за контролисано отпуштање етарског уља у симулираним условима гастро-интестиналног тракта (рН, 37 °С, ензими, соли). На крају, описана је примена нелинеарног математичког модела за анализу кинетике отпуштања укупних полифенола уља тимијана.

Резултати и дискусија су подељени у три поглавља: Карактеризација емулзионих система, Карактеризација алгинат/протеин хидрогел система и Карактеризација алгинат/протеин/лецитин хидрогел система.

У оквиру поглавља Карактеризација емулзионих система (Поглавље 5) приказани су добијени резултати свеобухватне карактеризације емулзионих система, полазећи од денатурације протеина у поступку припреме емулзија. Поређењем вредности зета потенцијала емулзија са нативним и денатурираним протеинима, непосредно након

припреме, закључено је да денатурација има значајан утицај на повећање стабилности емулзија. Реолошка својства натријум-алгинат/протеин/уље емулзија показала су зависност од концентрације натријум-алгината и/или протеина; са повећањем концентрације долази до повећања вискозности емулзија, што је у складу са повећаним уплитањем полимерних ланаца и алгинат-протеин интеракцијама. Применом Раманове спектроскопије на појединачне компоненте и емулзију закључено је да су капљице уља окружене и у интеракцији са протеинима, док се алгинат налази у континуалној фази емулзије.

У оквиру поглавља Карактеризација алгинат/протеин хидрогел система (Поглавље 6) приказана је карактеризација алгинат/протеин хидрогелова добијених техником електростатичке екструзије, укапавањем претходно припремљених емулзија у раствор калцијум-хлорида. FTIR анализа синтетисаних хидрогелова указала је на успешну инкапсулацију етарског уља, појавом карактеристичних трака уља у спектру честица. Испитивањем бубрења закључено је да се процес скупљања честица одвија у условима киселе средине, тј. у условима симулираног желудачног флуида, док у условима симулираног интестиналног флуида долази до апсорције флуида и бубрења. Анализом реолошких својстава алгинат/протеин хидрогел система примећено је постепено смањење чврстоће носача у условима симулираног желудачног флуида, док се у симулираном интестиналном флуиду ефекат слабења носача показао као интензивнији. Величина и облик честица биле су у функцији концентрације алгината и протеина, при чему је повећање концентрација проузроковало повећање пречника честица и појаву несферичности (изнад 1,5 мас.% алгината). Површинска морфологија узорака је била хрпавија и нехомогенија са повећањем концентрација алгината. Испитивањем механичке стабилности утврђено је да са повећањем концентрације алгината и/или протеина долази до повећања механичке чврстоће хидрогел система, односно до повећања модула еластичности. Такође, анализом термичке стабилности примећено је да протеини, адсорбовани на површини уљаних капљица, обезбеђују оптималну стабилност уља на температурама од 50, 75 и 100 °C, током временског периода од 3 сата. Ефикасност инкапсулације износила је до 80% за укупне полифеноле уља (одређено FC-методом), односно до 75,5% за тимол (одређено HPLC методом). Анализа отпуштања вршена је у циљу одређивања кинетике отпуштања укупних полифенола и појединачне компоненте уља, тимола, у симулираним условима гастроинтестиналног тракта. Код свих испитиваних узорака забележено је брзо иницијално отпуштање, при чему се отпуштање укупних полифенола одиграло до 210 мин, а тимола до 120 мин, у зависности од концентрације алгината и протеина у формулацији. На крају овог поглавља испитана је антиоксидативна активност уља након инкапсулације, тестирањем различитих формулација честица (на собној и повишеним температурама), као и применом различитих метода за одређивање антиоксидативног потенцијала. Антимикробна активност инкапсулираног уља испитивана је на сојевима *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*, микродилуционом методом. Микробицидни ефекат постигнут је на соју *C. albicans*, односно оптимизацијом хидрогел система и на бактеријске сојеве (*E. coli* и *S. aureus*), док се *B. cereus* показао као најотпорнији.

У оквиру Поглавља 7 приказана је оптимизација и карактеризација алгинат/протеин/лецитин система. FTIR анализом је потврђено постојање веза између компонената носача, као и носач-етарско уље. Након тога, анализом површинске морфологије узорака примећена је смањена порозност, односно затворена површина алгинат/протеин/лецитин система, уз присуство већих закривљења, као последица формирања фосфолипидних мицела. Тестирана су механичка и термичка својства хидрогелова, при чему је утврђен допринос лецитина овим својствима као последица стварања компактнијег заштитног филма око уљаних капи и смањења порозности система. Анализом отпуштања тимола (HPLC метода) и поређењем кривих отпуштања са истим формулацијама честица без лецитина, уочено је да лецитин доприноси споријем отпуштању уља у симулираним условима гастроинтестиналног тракта.

У поглављу Закључак (Поглавље 8) таксативно су наведени најважнији закључци, изведени на основу испитивања изложених у претходним поглављима. Након Поглавља 8 наведена је литература коришћена током израде докторске дисертације.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Докторска дисертација Мине М. Волић за предмет има савремену тему истраживања која се односи на инкапсулацију етарских уља у нове хидрогел системе на бази алгината и протеина, у циљу заштите и контролисаног отпуштања ових активних супстанци.

Прекомерна употреба антибиотика, у циљу третирања инфекција, довела је до пораста броја вишеструко резистентних патогена, док се потенцијал за постојањем патогених микроорганизама јавља и након излагања антимикуробним агенсима. Са друге стране, коришћење високих концентрација антимикуробних лекова доводи до нежељених ефеката у виду токсичности. Ограниченост везана за проналажење нових лекова који би имали ефикасније деловање на сузбијање инфекција, резистентних на већ постојеће антибиотике, алармирала је науку за проналажењем алтернативних извора антимикуробних лекова. Циљ је да се идентификују и истраже нова једињења са антибактеријским својствима без токсичног ефекта на здравље људи.

Биљке, односно њихови секундарни метаболити, представљају извор једињења са антимикуробном активношћу која пружају могућност новог, алтернативног извора антимикуробних лекова. Етарска уља и једињења која улазе у њихов састав показују одлична лековита својства, па се стога могу користити за лечење инфективних и неинфективних болести. Као модел једињење у овој докторској дисертацији коришћено је етарско уље тимијана (*Thymus vulgaris* L.). Захваљујући високом садржају тимола и карвакрола, компонентата које су најзаслужније за антимикуробна и антиоксидативна својства овог и других етарских уља, етарско уље тимијана сврстава се међу десет најкоришћенијих етарских уља у прехранбеној индустрији.

Међутим, изазов који се односи на стабилност етарских уља у току производње и складиштења ограничава њихову ширу примену. Додатно, варијације рН у гастроинтестиналном тракту могу довести до губитка биолошке активности уља. У складу са тим, велика пажња посвећује се заштити етарских уља у циљу обезбеђивања максималне ефикасности на месту деловања. Инкапсулација представља једну од најчешће коришћених технологија која омогућава превазилажење недостатака етарских уља попут њихове осетљивости, а затим и повећање биорасположивости, као и контролисано отпуштање на циљаном месту дејства. До сада су се за инкапсулацију етарских уља користиле различите технике, као што су спреј сушење, лиофилизација, инкапсулација на бази суперкритичних флуида и друге. Међутим, потреба за извођењем инкапсулације под благим условима, у циљу заштите активне компоненте од деградације, издвојила је електростатичку екструзију у односу на остале технике. Додатно, ова техника уз примену електростатичког потенцијала пружа могућност добијања честица микроетарских величина, уз једноставну контролу процеса.

Међу многим биополимерима који су се до сада користили у циљу инкапсулације, алгинат је јединствен у погледу хемијске стабилности, рН осетљивости, биорасположивости и биокомпатибилности. Међутим, иако су се алгинатни хидрогелови показали одличним носачима многих активних супстанци, ограничење примене овог материјала у системима за контролисано отпуштање последица је изразито хидрофилне природе алгината. Како би се активна супстанца могла сместити у носаче на бази алгината неопходно је извршити измене у структури самог хидрогела, у овом случају додатком амфифилних молекула - протеина. Протеини су се до сада користили за очвршћавање алгинатних носача за доставу лекова, биљних екстраката и пробиотица и за дизајнирање филмова и влакана у биомедицинске

сврхе, због велике биоразградивости, нецитотоксичности и високе термичке стабилности. Важне карактеристике протеина приписују се и способности задржавања воде, везивању уља и емулгујућим својствима, при чему су неке студије указале да комбиновање са полисахаридима може повећати способност протеина соје за везивањем воде. Из наведених разлога, отворила се могућност за формулисањем новог система на бази алгината и протеина соје за инкапсулацију етарског уља тимотијана, са циљем отпуштањем у доњем интестиналном тракту човека.

На основу опсежног прегледа литературе, може се закључити да се истраживања у оквиру ове докторске дисертације уклапају у светске трендове и указују на значај и актуелност проучаване проблематике.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације кандидата Мине М. Волић, цитирано је 242 литературна навода, од којих је највећи број новијег датума, што је омогућило преглед стања у испитиваној области, као и приказ актуелности теме. Савремена истраживања објављена у наведеним научним радовима су описана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су омогућили добар увид у потенцијал нових хидрогелова на бази алгината и протеина соје са инкапсулираним етарским уљем за примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији. На основу анализе резултата приказаних у научној литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Из списка наведене литературе и објављених радова које је кандидат приложио, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати у оквиру ове докторске дисертације су доказани одговарајућим експериментима, као и савременим аналитичким инструменталним мерењима према оригиналним или модификованим методама из литературе. Најпре је вршена припрема емулзионих система коришћењем Ultra-Turrax хомогенизатора, применом великих смицајних сила. Затим, вршена је карактеризација добијених емулзионих система одређивањем стабилности емулзија, односно праћењем промене зета потенцијала (ласерска дифракциона техника), испитивањем вискозности (на уређају за тестирање реолошких карактеристика материјала Нааке MARS реометар, који је опремљен са две паралелне плоче) и на крају анализом структурне организације молекула у емулзији, односно на уље/вода граници фаза, Рамановом спектроскопијом, погодном за анализу водених емулзија. Хидрогелови на бази алгината и протеина соје припремани су техником електростатичке екструзије, под благим условима. Карактеризација добијених хидрогелова рађена је у циљу одређивања профила бубрења (гравиметријска метода), затим њихове величине и облика (оптичка микроскопија) и површинске морфологије (скенирајућа електронска микроскопија, SEM). Такође, испитиване су интеракције између компонената носача и/или носач-инкапсулирано уље (инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовим трансформацијама, FTIR), а процењен је и утицај гастро-интестиналних услова на реолошко понашање хидрогел носача (Нааке MARS реометар са две паралелне плоче). Механичке карактеристике хидрогелова на бази алгината и протеина соје су испитане на савременом уређају за тестирање механичких карактеристика материјала (AG-Xplus Universal Testing Machine), у режиму компресије и коришћењем методе посебно прилагођене овој врсти узорака, док су термичке карактеристике носача испитане на температурама од 50, 75 и 100 °C. Затим, хидрогелови на бази алгината и протеина соје са инкапсулираним етарским уљем су тестирани у циљу одређивања ефикасности инкапсулације (спектрофотометријски - FC методом и течном хроматографијом под високим притиском - HPLC), као и проценом антиоксидативног (ABTS и CUPRAC

методе) и антимикуробног (микродилуциона метода) потенцијала инкапсулираног уља. На крају, вршено је испитивање потенцијалне примене добијених хидрогелова за контролисано отпуштање етарских уља (спектрофотометријски и течном хроматографијом под високим притиском). Добијени резултати кинетике отпуштања укупних полифенола, односно криве отпуштања анализиране су применом нелинеарног популационог модела, како би се предвидело понашање хидрогелова при отпуштању етарског уља.

У посебном поглављу урађена је оптимизација и карактеризација алгинат/протеин/лецитин хидрогелова, при чему су испитиване површинска морфологија, интеракције између алгината-протеина-лецитина и/или носач-инкапсулирано уље, механичке и термичке карактеристике носача, ефикасност инкапсулације и контролисано отпуштање етарског уља (тимола), научним методама које су претходно коришћене и за карактеризацију алгинат/протеин хидрогелова.

3.4. Применљивост остварених резултата

Након поређења резултата приказаних у оквиру ове докторске дисертације са до сада објављеним резултатима других истраживачких група, закључили смо да је остварен значајан допринос у развоју нових система за инкапсулацију етарских уља на бази алгината и протеина соје, који омогућавају контролисано/продужено отпуштање липофилних полифенола. Системи описани у овој тези имају велики потенцијал примене, од примене у функционалним прехранбеним производима, преко формулације нових прехранбених производа, затим у производњи нових, тзв. активних паковања, па до примене у фармацеутским производима. Поред тога, на основу резултата тезе може се предложити адекватан избор формулације, као и емулгатора (протеини или комбинација протеина и лецитина), који су дозвољени за употребу у храни и имају релативно ниску цену.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Спроводећи иновативна истраживања током израде докторске дисертације, кандидат Мина М. Волић, мастер инжењер технологије, показала је изузетну стручност и самосталност у планирању и реализацији експеримената, обради, анализи и дискусији добијених резултата, као и припреми публикација. Стручном и аналитичном приступу у постављању и спровођењу експеримената и истраживања посебно је допринео изразито инжењерски приступ који Мина М. Волић константно показује у свом раду. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је утврдила да кандидат Мина М. Волић, мастер инжењер технологије, поседује све неопходне квалитете за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Резултати до којих се дошло у оквиру ове дисертације дају значајан научни допринос у развоју нових хидрогел система на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља. Такође, резултати овог рада у целини дају научни допринос испитивању феномена инкапсулације етарског уља тимотијана у хидрогелове на бази алгината и протеина соје, као што су механизам настајања честица, интеракције између носача и активне компоненте и други феномени који утичу на ефикасност инкапсулације и активност инкапсулираног етарског уља. Посебни научни доприноси резултата истраживања остварених у оквиру ове докторске дисертације се огледају у следећем:

- Карактеризацији емулзија на бази алгината, протеина соје и етарског уља тимидана, анализом молекуларне организације алгинатних и протеинских ланаца у систему;
- Оптимизацији процеса инкапсулације етарског уља тимидана у нове хидрогелове на бази алгината и протеина соје припремљене техником електростатичке екструзије;
- Испитивању механизма и кинетике отпуштања полифенола из хидрогел система на бази алгината и протеина. Резултати су интерпретирани кроз структурне промене полимерних ланаца, односно кроз реолошке параметре и промене наелектрисања карактеристичних функционалних група, као и њихове оријентације на граници фаза;
- Идентификовању интеракција између етарског уља и носача, као и у утицају ових интеракција на термичку стабилност етарског уља и механичку стабилност носача;
- Испитивању утицаја инкапсулације на антиоксидативну и антимикробну активност етарског уља, применом различитих метода за анализу антиоксидативне активности и одређивањем вијабилности микроорганизама, респективно;
- Оптимизацији система алгинат/протеин/сурфактант за постизање ефикасније инкапсулације и споријег отпуштања и система алгинат/протеин за постизање најефективнијег антимикробног ефекта;
- Развоју метода за одређивање садржаја тимола и укупних полифенола етарског уља;
- Анализи стабилности испитиваних система кроз интеракције лецитина и протеина на граници фаза.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања која су изведена у овој докторској дисертацији конципирана су на основу претходно дефинисаних циљева и детаљне анализе литературе из области инкапсулације етарских уља у различите честичне системе. Иако је инкапсулација етарских уља последњих деценија доживела експанзију, мали је број студија који се баве инкапсулацијом ових липофилних биоактивних супстанци коришћењем природних носача на бази протеина. Такође, предност ове докторске дисертације јесте и чињеница да је коришћено етарско уље у целости, а не појединачна активна компонента, будући да етарска уља испољавају јаче позитивно дејство на људски организам захваљујући синергистичком дејству биоактивних једињења присутних у уљу.

Најпре је извршена денатурација протеина променом рН вредности (рН=8) и загревањем раствора на 80 °С током временског периода од 40 мин, како би се изложили хидрофобни делови протеина, присутни у унутрашњости глобула. Затим, вршена је припрема емулзија на бази алгината, денатурисаног протеина соје и етарског уља, техником емулзификације, према унапред дефинисаним условима. Показало се да са порастом садржаја алгината и/или протеина, услед међусобних интеракција, као и повећаног уплитања полимерних ланаца, долази до повећања вискозности емулзија. Такође, показало се да су капљице уља у емулзијама окружене молекулима протеина, који се везују за уље изложеним хидрофобним групама, док се молекули алгината налазе у окружењу.

За синтезу хидрогелова коришћена је метода електростатичке екструзије, која омогућава контролисану производњу честица жељених димензија, под благим условима. Величина и сферичност, као и површинска морфологија честица на бази алгината и протеина соје биле су у функцији њиховог састава, односно концентрације алгината и/или протеина. Показано је да степен бубрења и време достизања критичне тачке бубрења у симулираним условима гастро-интестиналног тракта зависи од концентрације биополимера. У киселој средини (симулираном желудачном флуиду) долази до скупљања честица, услед губитка негативног наелектрисања карбоксилних група алгината, док су апсорпција флуида и бубрење примећени у симулираним условима интестиналног флуида, као последица електростатичког одбијања између негативно нелектрисаних протеинских и алгинатних ланаца.

Резултати кинетике отпуштања етарског уља тимижана у симулираним условима гастро-интестиналног тракта указују на продужено отпуштање уља са порастом концентрације алгината и/или протеина, у временском периоду до 210 мин, у зависности од формулације. Анализом реолошких својстава алгинат/протеин носача, утврђено је да се смањење чврстоће носача одиграва постепено током целог периода у симулираном желудачном флуиду, иако је промена масе заустављена након 20 мин, као и отпуштање уља. Нагли пад чврстоће забележен је након излагања симулираном интестиналном флуиду, у првих 10 мин, што је у корелацији са њиховим најинтензивнијим бубрењем и отпуштањем уља, док се даље смањење чврстоће носача одиграло постепено.

Интеракције алгинат-протеин-уље потврдиле су присуство етарског уља у носачу. Испитивањем утицаја инкапсулације на термичку стабилност етарског уља потврђено је да су да протеини, адсорбовани на површини уљаних капљица, заслужни за обезбеђивање термичке заштите инкапсулираног уља, посебно на вишим испитиваним температурама (75 и 100 °C), услед додатне денатурације протеина и формирања компактнијег заштитног филма. Механичка стабилност хидрогел носача испитана је са аспекта утицаја концентрације алгината и протеина, где се показало да са повећањем концентрације једног или оба биополимера долази до повећања модула еластичности.

Антиоксидативни капацитет хидрогел честица варирао је у зависности од формулације, али и од температуре којој су честице биле изложене. Најмању антиоксидативну активност показали су системи са најнижом концентрацијом алгината и протеина, али и они који су третирани на 50 °C, с обзиром да на вишим температурама протеини подлежу додатној денатурацији и раскидању терцијарне структуре, при чему се повећава доступност аминокиселина са антиоксидативним потенцијалом. Микробицидни ефекат инкапсулираног етарског уља у хидрогел носаче постигнут је на соју *Candida albicans*, у испитиваном медијуму након 24 сата, док су се бактеријски сојеви (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*) показали као отпорнији. Оптимизацијом алгинат/протеин система, у смислу смањења концентрације протеина и повећања концентрације уља, остварен је бактерицидни ефекат на *E. coli* и *S. aureus*, док се услед изражене протеолитичке активности сој *B. cereus* показао као најотпорнији.

Оптимизацијом алгинат/протеин/лецитин система и успостављањем синергистичког дејства између протеина соје и лецитина, остварена је ефикаснија инкапсулација, као и спорије отпуштања уља у симулираном желудачном флуиду за 35-40% у односу на исте формулације без лецитина. Синергистички ефекат протеина и сурфактанта, који се одражава на стабилност емулзија, показан је разликом у вредностима зета потенцијала емулзија.

Развијене су методе за одређивање садржаја: 1) укупних полифенола уља тимижана – FC метода (UV спектрофотометријска метода применом *Folin-Ciocalteu* реагенса); 2) тимола (метода течне хроматографије под високим притиском – HPLC метода), оптимизацијом хроматографских услова који одговарају овом типу узорка (састав мобилне фазе, брзина протока, колона).

Ово истраживање отворило је нове правце за даљи развој нових биополимерних система за инкапсулацију етарских уља, што је у овој докторској дисертацији започето додатком лецитина, ради постизања још бољег контролисаног отпуштања ових компоненти, а са циљем добијања јединственог комерцијалног система који би био погодан за примену у већем броју прехранбених и фармацеутских производа.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Мина М. Волић је резултате истраживања добијене у току израде ове докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштавањем радова на међународним скуповима. Резултати досадашњег научно-истраживачког рада кандидата у овој области приказани су публикавањем 1 (једног) рада у

међународном часопису изузетних вредности (ознака групе M20: врста резултата M21a, 1 рад), затим 1 (једног) рада у истакнутом међународном часопису (ознака групе M20: врста резултата M22, 1 рад), као и 2 (два) рада објављена у зборницима скупова међународног значаја штампана у целини (ознака групе M30: врста резултата M33, 2 рада).

Списак радова који су резултат истраживања у оквиру ове докторске дисертације

Категорија M21a:

1. **Volić M.**, Pajić-Lijaković I., Djordjević V., Knežević-Jugović Z., Pećinar I., Stevanović-Dajić Z., Veljović Đ., Hadnadjev M., Bugarski B., Alginate/soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery, - *Carbohydrate Polymers*, vol. 200, pp. 15-24, 2018, **IF (2018)=6,044** (ISSN: 0144-8617)

Категорија M22:

1. **Volić M.**, Obradović N., Djordjević V., Luković N., Knežević-Jugović Z., Bugarski B.: Design of biopolymer carriers enriched with natural emulsifiers for improved controlled release of thyme essential oil, - *Journal of Food Science*, 2020, **IF(2019)=2,478** (ISSN: 0022-1147) (DOI: 10.1111/1750-3841.15499)

Категорија M33:

1. **Volić M.**, Obradović N., Djordjević V., Knežević-Jugović Z., Pećinar I., Stevanović-Dajić Z., Bugarski B., Encapsulation of thyme essential oil in alginate-casein beads for intestinal delivery, - *Proceedings of the IV International Congress "Food Technology, Quality And Safety"*, Novi Sad, Serbia, 2018, pp. 57-62, ISBN: 978-86-7994-056-8.
2. **Volic M.**, Djordjević V., Obradović N., Knežević-Jugović Z., Bugarski B., The Effect of protein addition into carrier for thyme oil delivery: In vitro protein digestion, - *Proceedings of the VI International Congress: „Engineering Environment and Materials in Processing Industry“*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 2019, pp. 260-265, DOI:10.7251/EEMEN1901260V, ISBN: 978-99955-81-28-2.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега наведеног Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Мине М. Волић, мастер инжењера технологије, под насловом „**Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља**“ представља значајан и оригиналан научни допринос у датој области, што је и потврђено кроз објављивање радова у часописима међународног значаја. Предмет и циљеви који су постављени су јасно наведени и у потпуности остварени. Комисија је мишљења да предметна докторска дисертација у потпуности испуњава све захтеване критеријуме, као и да је кандидат током израде дисертације показао изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове дисертације.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати овај Извештај и да га заједно са поднетом дисертацијом Мине М. Волић, мастер инжењера технологије, под називом „**Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља**“ изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду, као и да након завршетка процедуре позове кандидата на усмену одбрану дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 25. септембар 2020. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Верица Ђорђевић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Илинка Пећинар, доцент
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

.....
Др Бојана Баланч, научни сарадник
Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета у Београду