

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

| I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ | | |
|--|------------------|---|
| 1. Датум и орган који је именовано комисију: 21. 4. 2023. године, Наставно-научно веће Технолошког факултета Нови Сад | | |
| 2. Састав комисије у складу са <i>Правилима докторских студија Универзитета у Новом Саду</i> : | | |
| 1. Шћибан Марина | редовни професор | Биотехнологија, 13. 2. 2014 |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду | | председник |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |
| 2. Антов Мирјана | редовни професор | Биотехнологија, 1. 7. 2011. |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду | | ментор, члан |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |
| 3. Катона Јарослав | редовни професор | Технолошко-инжењерске хемије, 1. 10. 2022. |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду | | члан |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |
| 4. Кнежевић-Југовић Зорица | редовни професор | Биохемијско инжењерство и биотехнологија, 22. 1. 2014. |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду | | члан |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |
| 5. Безбрадица Дејан | редовни професор | Биохемијско инжењерство и биотехнологија, 20. 6. 2018. |
| презиме и име | звање | ужа научна област и датум избора |
| Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду | | члан |
| установа у којој је запослен-а | | функција у комисији |

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Име, име једног родитеља, презиме:
Маја, Маринко, Милошевић

2. Датум рођења, општина, држава:
10. 2. 1993, Книн, Хрватска

3. Назив факултета, назив претходно завршеног нивоа студија и стечени стручни/академски назив:
Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду, мастер академске студије - Биотехнологија, мастер инжењер технологије

4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија:
2016. година, Биотехнологија

III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Издавање, карактеризација и ензимска модификација пектинског полисахарида мускатне тикве (*Cucurbita moschata*)

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација је написана на српском језику, латиничним писмом, на 121 страни В5 формата, са 36 слика, 16 табела и 159 литературних навода.

Садржај докторске дисертације је подељен у 7 поглавља на следећи начин:

1. Увод (стр. 1)
2. Теоријски део (стр. 5)
3. Материјал и методи (стр. 23)
4. Резултати и дискусија (стр. 31)
5. Закључак (стр. 87)
6. Литература (стр. 91)
7. Прилог (стр. 105)

Дисертацију чине и садржај, списак скраћеница и ознака, кључна документацијска информација, сажетак на српском и енглеском језику, као и план третмана података.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У првом поглављу, *Увод*, експлицитно је указано на значај и актуелност проблематике којом се докторска дисертација бави. Истакнут је значај употребе мускатне тикве (*Cucurbita moschata*) за добијање пектинског полисахарида, као одговор на повећану потражњу за овим биополимером на тржишту. Описане су предности примене ензима за екстракцију овог полисахарида у односу на конвенционалне технике. Представљена је могућност добијања високовредних производа након ензимске модификације пектинског полисахарида. Описан је потенцијал пектинског полисахарида да са протеинима гради комплексне коацервате који могу бити широко примењени у биомедицини, прехранбеној и фармацеутској индустрији.

У поглављу *Теоријски део* дат је систематски преглед научне литературе подељен у пет потпоглавља. У првом потпоглављу, *Пектин*, описана је општа структура овог полисахарида, његово место и улога у ћелијском зиду биљака, као и примена пектина и његов утицај на здравље. Следеће потпоглавље, *Пектински полисахариди мускатне тикве*, описује значај употребе мускатне тикве као извора пектинског полисахарида и даје састав пулпе мускатне тикве. Такође, овде су наведени приноси пектина мускатне тикве доступни у литератури, као и неке од њихових карактеристика и својстава. У трећем потпоглављу, *Екстракција пектина*, описана је конвенционална екстракција пектина киселином уз наведене недостатке ове технике. Затим су описане ензимске и ензимски потпомогнуте киселе екстракције овог полисахарида, са нагласком на предности у односу на конвенционалну киселу екстракцију. Четврто потпоглавље, *Ензимска модификација пектина*, обрађује примену различитих пектинолитичких ензима у циљу модификације пектинског полисахарида и добијања нових производа измењених и побољшаних карактеристика и својстава. Посебна пажња је посвећена модификацијама ендо-полигалактуроназом и пектин-метилестеразом. У петом потпоглављу, *Комплексна коацервација*, описан је феномен комплексне коацервације, као и механизми одговорни за настајање оваквих комплекса. Такође, дат је кратак преглед литературе о комплексним коацерватима припремљеним од пектина из различитих извора, као и њихова својства и примене.

Треће поглавље, *Материјал и методи*, подељено је у шест потпоглавља. Прво потпоглавље, *Сировина*, описује све третмане којима је плод мускатне тикве подвргнут да би се добила осушена пулпа која је коришћена у даљем раду. У другом потпоглављу, *Ензими и њихова активност*, наведени су сви ензими који су коришћени за екстракцију (целулаза, ксиланаза, амилаза и протеаза) и модификацију (ендо-полигалактуроназа и пектин-метилестераза) пектинских полисахарида мускатне тикве и описани су методи за одређивање њихове активности. У потпоглављу *Екстракција пектинских полисахарида мускатне тикве* детаљно су описане различите технике екстракције: конвенционална кисела екстракција, ензимске екстракције и ензимски потпомогнуте киселе екстракције. У четвртном потпоглављу, *Ензимске модификације екстрахованих пектинских полисахарида*, описани су изведени експерименти ензимских модификација пектинских полисахарида. У петом потпоглављу, *Припрема комплексних коацервата*, објашњен је поступак припреме коацервата кисело екстрахованог пектинског полисахарида са овалбумином и са желатином. Последње потпоглавље, *Аналитички методи*, обухвата описе лабораторијских аналитичких метода коришћених за карактеризацију и одређивање својстава екстрахованих пектинских полисахарида, ензимски модификованих узорака и припремљених комплексних коацервата. Такође, описане су и статистичке анализе коришћене у овој дисертацији.

Резултати и дискусија су четврто, уједно и најобимније, поглавље дисертације у оквиру ког су сумирани добијени резултати из појединачних фаза истраживања, уз статистичку обраду података. Ово поглавље је подељено у пет целина. Унутар првог потпоглавља, *Карактеризација мезокарпа мускатне тикве*, окарактерисана је пулпа мускатне тикве, сировина даље коришћена за екстракцију пектинских полисахарида. У другом потпоглављу, *Изоловање пектинског полисахарида мускатне тикве*, дати су резултати временског тока ензимског третмана пулпе мускатне тикве различитим ензимима (целулаза, ксиланаза и амилаза - самостално или у комбинацијама) примењеним у различитим дозама у циљу избора оптималне дозе ензима и трајања ензимског третмана који ће омогућити олакшану екстракцију пектинског полисахарида из ове сировине. Такође, овде су приказани и приноси екстракције пектинског полисахарида

добијеног различитим екстракционим техникама (кисела екстракција, ензимске екстракције и ензимски потпомогнуте киселе екстракције). Треће потпоглавље, *Карактеристике и својства пектинских полисахарида мускатне тикве*, обухвата резултате и дискусију о карактеристикама и својствима различито екстрахованих пектинских полисахарида мускатне тикве. Ово потпоглавље је подељено у три целине. У првој и другој целини окарактерисани су сви узорци добијени уз примену киселине, односно добијени ензимским екстракцијама, редом. У трећој целини упоређене су карактеристике и својства кисело и ензимски екстрахованих пектинских полисахарида мускатне тикве са посебним фокусом на разлике у хемијском саставу, молекулској маси, *in vitro* антиоксидативној и гвожђе (II)-хелирајућој активности, вискозности, површинском наелектрисању, растворљивости и капацитету задржавања воде као последице различитих техника екстракције. У следећем потпоглављу, *Ензимске модификације пектинских полисахарида мускатне тикве*, описани су ефекти дејства ендо-полигалактуроназе, пектин-метилестеразе и њиховог здруженог деловања на карактеристике и својства модификованих пектинских полисахарида мускатне тикве. Додатно, модификовани узорци су поређени са одговарајућим немодификованим пектинским полисахаридима мускатне тикве, уз јасно описана побољшања карактеристика и својстава услед дејства примењених ензима. Такође, упоређени су и утицаји примењених ензимских модификација на особине и својства пектинских полисахарида мускатне тикве. Унутар последњег потпоглавља, *Комплексна коацервација кисело екстрахованог пектинског полисахарида мускатне тикве*, процењена је способност овог полимера да формира комплексне коацервате са овалбумином и желатином уз описане карактеристике формираних коацервата у погледу њихове хемијске структуре, реолошких својстава и механичке стабилности. Коначно, сагледана је могућност примене ових коацервата као носача различитих биоактивних једињења у системима за оралну доставу лекова кроз процену њихове стабилности у симулираним условима гастроинтестиналног тракта.

У поглављу *Закључак* систематизовани су закључци који су концизно и разложно изведени из добијених резултата и њихове дискусије.

Поглавље *Литература* садржи 159 литературних навода, који су прегледно систематизовани и правилно цитирани. Изабране референце су актуелне и примерене проучаваној тематици.

У последњем поглављу *Прилог* налазе се комплетни резултати истраживања који употпуњују ову дисертацију.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

M21a:

1. **Maја Milošević & Mirjana Antov (2022).** Pectin from butternut squash (*Cucurbita moschata*) – The effect of enzyme-assisted extractions on fiber characteristics and properties. *Food Hydrocolloids*, 123, 107201, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107201>
2. **Maја Milošević, Tatjana Đorđević & Mirjana Antov (2020).** Complex coacervation of acid-extracted fiber from butternut squash (*Cucurbita moschata*) and protein. *Food Hydrocolloids*, 108, 105999, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105999>

VII ZAKЉUČCI OДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА:

На основу изложених резултата и дискусије у оквиру ове дисертације, могу се донети следећи закључци:

- Испитивани начини екстракције су имали велики утицај на принос пектинског полисахарида. Принос конвенционалне киселе екстракције је износио 60,6 mg/g_{SM}. Добијени резултати су показали да је било могуће повећати принос пектинског полисахарида када киселој екстракцији претходи ензимски третман или чак добити сличан принос када се за екстракцију користе ксиланаза и целулаза без накнадног корака екстракције са киселином (59,9 mg/g_{SM}). Додатно, на повећање приноса су већи утицај имале целулаза и ксиланаза него амилаза и протеаза. Највећи принос је постигнут за ензимски потпомогнуту киселу екстракцију чији је корак ензимског претретмана подразумевао употребу целулазе, ксиланазе и амилазе (104,4 mg/g_{SM}), док је са друге стране, ензимска екстракција самосталном амилазом резултирала најнижим приносом пектинског полисахарида (32,9 mg/g_{SM}).
- Различите технике екстракције су резултирале различитим хемијским саставима пектинских полисахарида. Применом ензима за екстракцију пектинских полисахарида мускатне тикве је било могуће добити и до 3 пута већи садржај галактуронске киселине него конвенционалном киселом екстракцијом (29,0 g/100 g). Највећи садржај је одређен у узорку добијеном у амилазом потпомогнутој киселој екстракцији (84,4 g/100 g).
- Према одређеном степену метоксилације, сви пектински полисахариди, осим оног екстрахованог конвенционалном киселом екстракцијом, су се могли уврстити у нискометоксиловане пектине.
- Након одређивања удела различитих структурних домена који улазе у састав молекула пектинских полисахарида, утврђено је да је садржај хомогалактуронана генерално био већи код пектинских полисахарида добијених у ензимски потпомогнутим киселим екстракцијама него код оних добијених у ензимским екстракцијама. Највећи садржај је одређен код узорка добијеног у амилазом потпомогнутој киселој екстракцији (77,93%), а најнижи код кисело екстрахованог пектинског полисахарида (14,52%). Супротно је важило за садржај рамногалактуронана-I; највећи садржај је одређен код кисело екстрахованог пектинског полисахарида (43,51%), а најмањи код узорка добијеног у амилазом потпомогнутој киселој екстракцији (10,44%).
- У киселим екстракцијама су генерално добијени пектински полисахариди који су у својим растворима имали више агрегата, али је Mw био већи код првих молекулских фракција ензимски екстрахованих пектинских полисахарида, елуираних са гел-пермеационе колоне, него код оних екстрахованих киселином. Додатно, постојале су разлике и у изгледу хроматограма различито екстрахованих пектинских полисахарида, при чему је код ензимски екстрахованих постојала још једна молекулска фракција која је била одсутна код кисело екстрахованих узорака.
- Одређивањем укупних фенола, антиоксидативне и гвожђе (II)-хелирајуће активности је утврђено да је примена киселине у екстракцији имала негативан утицај на ове особине. Највећи садржај фенола одређен је код узорка екстрахованог целулазом и ксиланазом (1159,91 μg FK/g), највећа ABTS активност код пектинског полисахарида екстрахованог целулазом, ксиланазом и амилазом (2420,42 μM TE/100 g), а највећа Fe²⁺-хелирајућа активност код узорка екстрахованог амилазом (2131,46 μM EDTA/100 g). Најниже вредности ових параметара су одређене код кисело екстрахованог пектинског полисахарида.
- На вискозност пектинских полисахарида је већи утицај имао избор ензима примењених за екстракцију, него то да ли је у те сврхе коришћена киселина. Већа вискозност је измерена код пектинских полисахарида за чије је добијање коришћена амилаза, него код оних који су екстраховани уз третман ксиланазом и целулазом. С друге стране, растворљивост пектинских

полисахарида је била већа код свих пектинских полисахарида код којих су у ензимском кораку екстракције коришћене ксиланаза и целулаза (више од 77%), него када је коришћена само амилаза (58,9%).

- Одређивањем Михаелис-Ментенине константе ендо-полигалактуроназе је утврђено да је овај ензим показао највећи афинитет ка пектинским полисахаридима добијеним у ензимски потпомогнутим киселим екстракцијама. Највећи афинитет је ендо-полигалактуроназа показала ка узорку добијеном у амилазом потпомогнутој киселој екстракцији ($K_M = 13,3 \text{ mg/mL}$), а најмањи ка пектинском полисахариду екстрахованом самосталном амилазом ($K_M = 58,8 \text{ mg/mL}$).

- Модификација ендо-полигалактуроназом је резултирала смањењем молекулских маса и вискозности свих испитаних узорака. Код пектинских полисахарида добијених ензимски потпомогнутим киселим екстракцијама су ова смањења била највећа; највеће промене у молекулској маси и вискозности су примећене код узорка добијеног у амилазом потпомогнутој киселој екстракцији.

- Модификација ендо-полигалактуроназом је такође утицала на повећање *in vitro* антиоксидативне активности и Fe^{2+} -хелирајуће активности у односу на ове активности код немодификованих пектинских полисахарида. Највеће повећање ABTS активности (2,6 пута) је забележено код узорка добијеног у амилазом потпомогнутој киселој екстракцији, а најмање (1,3 пута) код кисело екстрахованог пектинског полисахарида. Насупрот томе, Fe^{2+} -хелирајућа активност кисело екстрахованог пектинског полисахарида је након модификације била највише повећана (25 пута), док је до најмањег повећања дошло код узорка екстрахованог целулазом и амилазом (6%).

- Модификација пектин-метилестеразом је довела до деестерификације свих пектинских полисахарида. Степен метоксилације је након ове модификације у трајању од 60 минута најмање смањен код кисело екстрахованог пектинског полисахарида (2,3 пута), док је код већине осталих узорака дошло до смањења од 3,5 пута.

- Након модификације пектин-метилестеразом, дошло је до повећања молекулске масе и вискозности свих пектинских полисахарида, осим код узорка добијеног у целулазом и ксиланазом потпомогнутој киселој екстракцији. Већи интензитет ових промена је примећен код ензимски екстрахованих пектинских полисахарида него код оних који су добијени са додатним кораком киселе екстракције.

- ABTS активности пектин-метилестеразом модификованих пектинских полисахарида су биле веће од одговарајућих немодификованих узорака. ABTS активност је била дупло повећана код модификованог кисело екстрахованог пектинског полисахарида, што је уједно била и највећа промена ове активности, док је најмање повећање (24%) примећено код узорка екстрахованог самосталном амилазом.

- Након испитивања ефекта здруженог дејства ендо-полигалактуроназе и пектин-метилестеразе на пектинске полисахариде мускатне тикве, закључено је да су интензитети смањења молекулске масе и вискозности били скоро дупло већи него код смањења ових особина након модификације самосталном ендо-полигалактуроназом. Здружено дејство ова два ензима је у већој мери утицало на смањење Mw и вискозности код ензимски екстрахованих пектинских полисахарида, него код оних добијених у ензимски потпомогнутим киселим екстракцијама. Mw је највише смањен код пектинског полисахарида добијеног у екстракцији целулазом и ксиланазом, као и у екстракцији целулазом, ксиланазом и протеазом. Са друге стране, узорак екстрахован амилазом је након ове модификације испољио највећи интензитет смањења вискозности (чак 14 пута) у односу на немодификован пектински полисахарид. Након модификације здруженим ензимима је расподела молекулских маса модификованих пектинских полисахарида била униформнија, што се огледало у мањој полидисперзности молекулских фракција модификованих него немодификованих узорака.

- Модификација здруженом ендо-полигалактуроназом и пектин-метилестеразом је довела до повећања ABTS и гвожђе (II)-хелирајуће активности свих испитиваних пектинских полисахарида мускатне тикве. Повећања у овим особинама су била скоро дупло већа од повећања добијених модификацијом пектинских полисахарида самосталном ендо-полигалактуроназом. Највеће повећање у антиоксидативној активности је постигнуто код кисело екстрахованог узорка (4,2 пута), а најмање код пектинског полисахарида добијеног у целулазом и ксиланазом потпомогнутој киселој екстракцији (2,1 пут). Fe^{2+} -хелирајућа активност кисело екстрахованог пектинског полисахарида је након модификације здруженим ензимима повећана чак 44 пута, док је најмање

повећање уочено код узорка добијеног у амлазом потпомогнутој киселој екстракцији (5%).

- При испитивању могућности примене кисело екстрахованог пектинског полисахарида као полианјонске компоненте за формирање комплексних коацервата са желатином и овалбумином, мерењем зета потенцијала и замућења суспензија при различитим односима мешања, утврђено је да је оптимална рН за припрему коацервата одговарала рН где је зета потенцијал смеше био једнак нули.

- Принос коацервације кисело екстрахованог пектинског полисахарида са желатином је био већи од приноса коацервације када је поликатјонска компонента била овалбумин. Највећи принос коацервације је постигнут када су пектин и желатин, под примењеним условима, помешани у односу 1:2.

- Реолошким мерењима је утврђено да су коацервати са желатином имали и до 3 пута механички стабилнију структуру од коацервата са овалбумином. Најстабилнији коацерват је формиран када су пектин и желатин, под примењеним условима, помешани у односу 1:1.

- Стабилност комплексних коацервата у симулираним гастроинтестиналним условима је била дупло већа код коацервата пектинског полисахарида и овалбумина. Највећу стабилност су испољили коацервати пектина са овалбумином када су помешани у односима 1:1 и 1:2 у симулираним условима желуца при чему није дошло до растварања ових коацервата, док је у симулираним условима црева најстабилнији био коацерват са овалбумином припремљен у односу 1:2 (растворљивост 34%). Најмања стабилност је одређена код коацервата пектина и желатина, при чему је растворено око 20% и око 90% коацервата припремљених у свим односима мешања, у симулираним условима желуца и црева, редом.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:

Приказ резултата докторске дисертације подељен је на адекватно конципиране сегменте, који сваки за себе представља целину, а у складу је са дефинисаним циљевима истраживања. Резултати истраживања проистекли су из оригинално осмишљених и постављених лабораторијских експеримената, систематизовани су у логичне целине, адекватно су обрађени рачунски и статистички и приказани су прегледно и јасно у виду слика и табела. На основу студиозне дискусије и тумачења добијених резултата, које је изведено уз повезивање са резултатима других аутора у области изоловања, карактеризације и модификације пектина, као и његове комплексне коацервације, изведени су одговарајући закључци.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме?

Докторска дисертације је у потпуности написана у складу са образложењима наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе?

Докторска дисертација садржи све битне елементе који се захтевају за радове ове врсте.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

Докторска дисертација указује на могућност употребе мускатне тикве (*Cucurbita moschata*), до сада мање истраженог извора, за добијање пектинског полисахарида као одговор на растућу потражњу за овим полисахаридом на тржишту. Пектински полисахариди екстраховани из ове сировине еколошки прихватљивим техникама (ензими) су испољили супериорније карактеристике и својстава од оног добијеног конвенционалном киселом екстракцијом. Додатно, унутар дисертације описан је ефекат дејства пектинолитичких ензима на добијање ензимски модификованих пектинских полисахарида мускатне тикве знатно побољшаних карактеристика и својстава у односу на немодификоване узорке. Такође, успешно су припремљени и комплексни коацервати пектинског полисахарида мускатне тикве са протеинима, који су показали велики потенцијал за примену у контролисаној достави биолошки активних једињења.

4. Који су недостаци дисертације и какав је њихов утицај на резултат истраживања?

Недостаци докторске дисертације нису уочени.

X ПРЕДЛОГ:

На основу наведеног, комисија предлаже:

- а) да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана;
- б) да се докторска дисертација врати кандидату на дораду (да се допуни односно измени);
- в) да се докторска дисертација одбије.

Место и датум: 27. 4. 2023. у Новом Саду

1. др Марина Шћибан, редовни професор,
председник

2. др Мирјана Антов, редовни професор,
ментор члан

3. др Јарослав Катона, редовни професор,
члан

4. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни
професор члан

5. др Дејан Безбрадица, редовни професор,
члан

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај и да исти потпише.