

Univerzitet u Novom Sadu  
Tehnološki fakultet  
Bulevar Cara Lazara 1  
Novi Sad

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Број 020-421/3  
25.10.2000 год.  
НОВИ САД

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU TEHNOLOŠKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U NOVOM SADU**

**PREDMET:** Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije  
mr Mirjane G. Antov

Nastavno-naučno veće Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu je na I sednici održanoj 12. oktobra 2000. godine imenovalo je Komisiju za ocenu i odbranu urađene doktorske disertacije kandidata mr Mirjane G. Antov, pod nazivom "**RASPODELA PEKTINAZA U VODENIM DVOFAZNYM SISTEMIMA**" u sledećem sastavu:

1. Dr Suzana Petrović, redovni profesor Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, predsednik;
2. Dr Draginja Peričin, redovni profesor Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, mentor, član;
3. Dr Slavko Kevrešan, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, član.

Komisija je, u navedenom sastavu, pregledala urađenu doktorsku disertaciju mr Mirjane G. Antov i Nastavno-naučnom veću podnosi sledeći

**IZVEŠTAJ  
O OCENI DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija kandidata mr Mirjane G. Antov, pod nazivom "Raspodela pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima", napisana je na 88 strana, u skladu sa savremenim principima izlaganja rezultata naučno-istraživačkog rada, i sadrži 20 tabela, 13 slika i 188 literaturnih navoda. Doktorska disertacija obuhvata 7 poglavlja: Uvod, Teorijski deo, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura i Skraćenice i oznake.

U disertaciji je, pored navedenog, predstavljeni ključna dokumentacijska informacija, sa izvodima na srpskom i engleskom jeziku, u skladu sa važećom zakonskom regulativom, i sadržaj.

U poglavlju **UVOD** ukazano je na potrebu uvođenja novih vrsta tehnika, koje se koriste u biohemiji, a koje bi adekvatno mogle pratiti razvoj ove nauke, kako na fundamentalnom, tako i na primenjenom planu. Bez obzira na postojanje velikog broja metoda za razdvajanje i prečišćavanje biohemijski važnih jedinjenja, novi kriterijumi obuhvataju i potrebu za povećanom selektivnošću razdvajanja i prečišćavanja ekstremno osetljivih proteina, kakvi su npr. enzimi. U tom smislu se razdvajanje enzima raspodelom u vodenim dvofaznim sistemima izdvaja kao jedna od najatraktivnijih tehnika, ne samo po brzini izvođenja i efikasnosti učinka, već i po osobinama, koje ih čine pogodnim za rad sa biološkim materijalima.

U skladu sa savremenim trendom upotrebe vodenih dvofaznih sistema za kultivaciju mikroorganizama u cilju produkcije enzima, čime se otvara mogućnost zamene mehaničkog odvajanja biomase od proizvoda ekstrakcionim procesom, u kome su uslovi odabrani tako, da omoguće njihovu raspodelu u suprotne faze, definisano je i opredeljenje rada na izučavanju raspodele pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima, sastavljenim od polietilen glikola i dekstrana, sa ciljem da se ispita:

- uticaj molekulske mase dekstrana, masenog udela polimera, dužine veznih linija i odnosa zapremina faza na raspodelu pektinaza u model sistemima, iskazan kroz parametre koji karakterišu ovaj fenomen, kao što su koeficijent raspodele, prinos i stepen prečišćenosti u gornjoj fazi;
- uticaj vrste i koncentracije neorganskih soli, dodatih u dvofazni model sistem, na raspodelu pektinaza, praćenjem navedenih parametara raspodele, kao i uticaj pH u model vodenim dvofaznim sistemima;
- mogućnost kultivacije gljive *Polyporus squamosus* u vodenom dvofaznom sistemu, sastavljenom od polietilen glikola i dekstrana, sa ciljem istovremenog dobijanja dva proizvoda, pektinaza i biomase, koji bi bili razdvojeni u različitim fazama, a na osnovu rezultata dobijenih u model sistemima;
- mogućnost kultivacije *P. squamosus* i dobijanje pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima, koji bi umesto pektina, sadržavali izlužene repine rezance.

U poglavlju **TEORIJSKI DEO**, kroz pregled najnovije literature, objašnjen je pojam i nastajanje vodenih dvofaznih sistema, kao uvod u predstavljanje njihove primene, kako u biohemiji, tako i u mnogobrojnim granama nauke.

Deo o teorijskim aspektima razdvajanja faza u vodenim dvofaznim sistemima obuhvata pregled važećih teorija o nastajanju faznih sistema sa termodinamičkog stanovišta, kao i aktuelnih doprinosa ovim razmatranjima.

Iako zapravo tercijalni, ukazano je na uobičajen način predstavljanja dvofaznih vodenih sistema kao dvokomponentnih, putem dvodimenzionalnih faznih dijagrama. Veličine, koje se mogu određivati sa ovakvog dijagrama, se odnose na dužinu veznih linija i odnos zapremina faza, koje su u tekstu i definisane.

Objašnjen je i princip razdvajanja supstanci u vodenim dvofaznim sistemima i definisani su parametri, koji karakterišu ovaj fenomen, kroz koeficijent raspodele i prinos u gornjoj fazi. Ukazano je na značaj pravog izbora mnogobrojnih faktora, koji su od značaja prilikom

razdvajanja supstanci u vodenim dvofaznim sistemima, a koji se odnose na osobina sistema, sa jedne, odnosno, supstance, sa druge strane. Zatim sledi pregled karakteristika supstance, koje utiču na njenu raspodelu, a koje obuhvataju njenu molekulska masu, naelektrisanje i hidrofilnost/hidrofobnost. Kroz detaljan pregled literature, objašnjen je uticaj molekulskih masa polimera, koncentracije konstituenata faznog sistema, dužine veznih linija, zapreminskog odnosa, kao i vrste i koncentracije jona i pH dvofaznog sistema na raspodelu.

Vodeni dvofazni sistemi su, kao moderna i efikasna separaciona tehnika, našli široku primenu ne samo u fundamentalnoj i primenjenoj biohemiji, već i u mnogim drugim granama nauke. Dat je i pregled njihove primene u analitičke svrhe i za razdvajanje proteina, delova ćelija i samih ćelija, potkrepljen najnovijim literaturnim navodima. Posebna pažnja je posvećena upotrebi vodenih dvofaznih sistema za biološke konverzije, kako enzimske, tako i mikrobiološke prirode. Pri tome je ukazano na prednosti upotrebe ovakvih sistema, koje se ogledaju u mogućnosti povećanja prinosa i produktivnosti u odnosu na konvencionalne ekstrakcije, lakom projektovanju u industrijskim razmerama, smanjenju inhibicije proizvodom njegovim uklanjanjem neposredno po nastanku, sprečavanju raspadanja proizvoda skraćivanjem vremena boravka u blizini biokatalizatora, pri čemu je upotreba ovakvih sistema, moglo bi se reći, čak i neophodna u slučajevima stvaranja veoma toksičnih ili nestabilnih proizvoda. Dalje, biokonverzije u vodenim dvofaznim sistemima pružaju mogućnost kontinualnog izvođenja operacije, uz zadržavanje i ponovnu upotrebu biokatalizatora, čime se takođe značajno povećava ukupna produktivnost, a integracijom delova procesa, u kojim se izvodi biokonverzija i izdvajanje i prečišćavanje proizvoda, smanjuje se broj koraka u operacijama njegovog dobijanja.

Ukazano je i na činjenicu da se operacije u vodenim dvofaznim sistemima mogu izvoditi na šaržni i kontinualni način, a literaturno su potkrepljeni, kao prednosti, tako i nedostaci svakog od njih.

Kako je ova doktorska disertacija orijentisana na ispitivanje raspodele pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima, u teorijskom delu je predstavljen detaljan pregled najnovije literature, koja se odnosi na ove enzime, a posebna pažnja je posvećena mehanizamima, koji su od značaja prilikom regulacije njihove sinteze i sekrecije kod fungi. Ukazano je i na značaj koji fungalne pektinaze imaju u procesima biljne patogeneze, kao deo enzimskog kompleksa koji razgrađuje ćelijski zid biljke. Potreba za prevencijom biljnih bolesti izazvanih fitopatogenim plesnima, doprinela je, u poslednje vreme, intenzivnom istraživanju pektinaza i karakterizaciji gena koji kodiraju njihovu sintezu, čime se, sudeći po citiranoj najnovijoj literaturi iz ove oblasti, otvaraju mogućnosti da se do detalja ne samo upozna, već i utiče na proces njihove ekspresije.

Pored toga, dat je i prikaz industrijske proizvodnje pektinaza, uporedo sa pregledom tehnika kultivacije, medijuma i najnovijih tehnika, koje se vrše na molekularnom nivou kod industrijski važnih fungi u cilju poboljšanja vrsta. Pri tome je istaknuto da bi kultivacija fungi u vodenim dvofaznim sistemima, koja do sada nije ostvarena, predstavljala elegantno i integralno rešenje procesa dobijanja i izolacije ovih enzima.

Kroz pregled najnovijih literaturnih navoda opisane su oblasti i tehnike primene fungalnih pektinaza, kao i prednosti njihovog korišćenja u procesima ceđenja i maceracije

biljnog tkiva, sa osvrtom na najnovije trendove upotrebe ovih enzima u proizvodnji funkcionalne hrane.

Sledi, zatim, detaljno literaturno potkrepljen, prikaz produkcije, osobina i primene pektinaza gljive *Polyporus squamosus*.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** navedeno je koje su hemikalije i komercijalni enzimski preparat korišćeni u radu, a takođe i proizvodni mikroorganizam, uz uslove dobijanja inokuluma i same inokulacije. U ovom poglavlju je predstavljen i način pripreme model vodenih dvofaznih sistema, određivanja binodalnih krivih i veznih linija, sastava faza, kao i podloga za kultivaciju u homogenim i dvofaznim sistemima.

Predstavljene su i procedure za određivanje:

- biomase, preko sadržaja RNA, spektrofotometrijskom metodom;
- redukujućih šećera, računatih na glukozu, spektrofotometrijskom metodom;
- proteina, spektrofotometrijskom metodom, uz BSA kao standard;
- aktivnosti endo-pektinaze viskozimetrijskom metodom, praćenjem smanjenja specifičnog viskoziteta reakcione smeše;
- aktivnosti egzo-pektinaze spektrofotometrijskom metodom, merenjem produkata nastalih delovanjem enzima, a izraženih kao galakturonska kiselina;
- aktivnosti dekstranaze, spektrofotometrijskom metodom.

Definisani su parametri raspodele, koji će biti praćeni u eksperimentima - koeficijent raspodele (K), prinos u gornjoj fazi (Y) i stepen prečišćenosti u gornjoj fazi (st.preč.), a data je i jednačina po kojoj je izračunavana dužina veznih linija.

Koncepcija predstavljanja i diskusije rezultata u poglavlju **REZULTATI I DISKUSIJA** podrazumeva definisanje dvofaznog sistema u kojima su vršeni eksperimenti raspodele, u smislu određivanja binodalne krive i položaja veznih linija. Zatim sledi prikaz ispitivanih parametara raspodele pektinaza komercijalnog preparata u model dvofaznim sistemima, uz, literaturom potkrepljeno, analiziranje i objašnjenje rezultata, i, kao poslednji korak, koji proishodi iz rezultata prethodnih eksperimenata, predstavljanje rezultata ogleđa kultivacije *Polyporus squamosus* u vodenim dvofaznim sistemima.

Rezultati ispitivanja komercijalnog enzimskog preparata i uzoraka kultivacionih tečnosti na aktivnost dekstranaze su bili negativni, čime je jedan od uslova održanja dvofaznog sistema kao takvog, bio ispunjen.

Raspodela pektinaza komercijalnog preparata praćena je u model sistemima sastavljenim od polietilen glikola 4000 i dve vrste dekstrana - sirovog i dekstrana 40000. Uticaj udela polietilen glikola i sirovog dekstrana na parametre raspodele pektinaza je ispitivana tako što je udeo jednog od polimera menjan uz nepromenjen udeo drugog. Povećanje udela polietilen glikola pri stalnom udelu od 7.5% (w/w) sirovog dekstrana pokazalo je negativan uticaj na koeficijente raspodele endo-pektinaze (endo-p) i egzo-pektinaze (egzo-p) i njihove stepene prečišćenosti u gornjoj fazi, ali je povećalo odnos zapremine faza. Najveće vrednosti K su dobijene pri najnižoj ispitivanoj vrednosti udela polietilen glikola od 5% (w/w) i iznosile su 1.76 za endo-p i 1.22 za egzo-p, dok su najveće vrednosti stepena prečišćenosti, dobijene pri istim uslovima iznosile za endo-p 6.66, odnosno za egzo-p 7.30. Ovakvo ponašanje oba

ispitivana tipa pektinaza je pripisano povećanju hidrofobnosti gornje faze sa povećanjem udela polietilen glikola i težnjom enzima ka manje hidrofobnoj sredini. Isto ponašanje su endo-p i egzo-p ispoljili i u model sistemu sastavljenom od polietilen glikola 4000 i dekstrana 40000 - najbolji parametri raspodele su postignuti pri najnižem ispitivanom udelu dekstrana 40000 - 7.5% (w/w) uz stalnih 7.5% (w/w) polietilen glikola, ali su i tada njihove vrednosti za endo-p (npr.  $K_{\text{endo}}$  0.22) bile znatno niže od onih u sistemu sa sirovim dekstranom, dok je  $K_{\text{egzo}}$  iznosio 2.04. Generalno su stepeni prečišćenosti endo-p i egzo-p u gornjoj fazi u sistemu sa sirovim dekstranom bili viši od onih u sistemu sa sdekstranom 40000.

Ispitivanje uticaja masenog udela sirovog dekstrana na raspodelu pektinaza u model sistemu vršeno je pri stalnoj vrednosti za udeo polietilen glikola od 5% (w/w) Najveći koeficijent raspodele endo-p je dobijen u sistemu sastava 5% (w/w)/ 5% (w/w) i iznosio je 2.43, dok je najveći  $K_{\text{egzo}}$  bio 0.79 i postignut u sistemu sa 3% (w/w) sirovog dekstrana. Povećanje udela sirovog dekstrana je imalo negativan uticaj na stepene prečišćenosti oba tipa pektinaza, te su maksimalne vrednosti postignute u sistemu sa najnižom ispitivanom vrednošću dekstrana od 3% (w/w). Različit uticaj, koji je promena udela sirovog dekstrana imala na koeficijente raspodele endo-p i egzo-p, objašnjen je polidisperznošću ovog polimera i različitim raspodelom frakcija molekulskih masa u sistemima različitog sastava.

Ispitivanje uticaja dužine veznih linija na raspodelu pektinaza enzimskog preparata u model sistemu polietilen glikol/ sirovi dekstran (uz uslov da je odnos zapremina faza bio jednak jedinici) pokazalo je da je povećanje njihove dužine uticalo na smanjenje, kako koeficijenata raspodele endo- i egzo-p, tako i prinosa u gornjoj fazi. Najbolji rezultati su dobijeni u dvofaznom sistemu sastava 5% polietilen glikol/ 4% sirovi dekstran, sa pripadajućom najkraćoj ispitivanom veznom linijom dužine 7.44% - koeficijenti raspodele endo-p i egzo-p su bili 1.66 i 0.95, a prinosi u gornjoj fazi 60.85% za endo-p, odnosno 47.07% za egzo-p. Ovakav uticaj dužine veznih linija na raspodelu enzima objašnjem je adekvatnim promenama u hidrofobnosti i međufaznom potencijalu. Promene u stepenu prečišćenosti sa povećanjem dužine veznih linija, koje po trendu nisu pratile promenu koeficijenata raspodele (najveći stepen prečišćenosti endo-p, 6.14, na veznoj liniji dužine 17.36%, odnosno egzo-p, 5.84, na veznoj liniji 22.30%) pripisane su neselektivnoj raspodeli ostalih proteina, izazvanoj polidisperznošću sirovog dekstrana.

Kako je za efikasnu separaciju u vodenim dvofaznim sistemima i dobar prinos potrebno odabrati optimalan odnos zapremina faza, ispitan je uticaj ove veličine na parametre raspodele na veznoj liniji dužine 13.98%. Povećanje odnosa zapremina faza smanjilo je koeficijente raspodele endo-p i egzo-p, kao i stepene njihove prečišćenosti, a u isto vreme povećalo, do izvesne granice, prinos u gornjoj fazi model sistema sastavljenog od polietilen glikola 4000 i sirovog dekstrana. Tako je pri odnosu zapremina faza od 0.1,  $K_{\text{endo}}$  bio 1.62, a  $K_{\text{egzo}}$  1.04, dok je pri vrednosti ovog odnosa od 3.0 postignut prinos od 70.33% za endo-p i 68.65% za egzo-p u gornjoj fazi sistema.

Na veznoj liniji dužine 7.44%, koja je bila najbliža binodalnoj krivi, velike promene u vrednosti odnosa zapremina nisu izazvale adekvatno smanjenje koeficijenta raspodele egzo-p i endo-p, dok je u isto vreme prinos enzima u gornjoj fazi rastao sa povećanjem ove veličine. Ovi rezultati su ukazali na mogućnost da proteini, odgovorni za enzimsku aktivnost, pokazuju optimalno ponašanje u onom delu faznog dijagrama dvofaznog sistema, sastavljenog od dva

polimera, u kome su razlike između sastava faza manje tj. na veznim linijama bliskim binodalnoj krivi, kao što je to pokazano za sisteme polimer/so.

Dodatak amonijum sulfata i natrijum sulfata u model sistem sastavljen od polietilen glikola 4000 i sirovog dekstrana, u koncentracijama od po 15 mmol/l povećao je koeficijente raspodele endo-p 1.25, odnosno 1.2 puta, dok je  $K_{egzo}$  u prisustvu 15 mmol/l amonijum sulfata i 5 mmol/l natrijum sulfata bio za 60% veći od onog u sistemu bez soli. Dalje povećanje koncentracije soli u dvofaznom model sistemu negativno je uticalo, kako na koeficijente raspodele pektinaza, tako i na prinos i prečišćenost u gornjoj fazi, što je objašnjeno delovanjem soli na više nivoa prilikom raspodele proteina. Generalno, veći stepeni prečišćenosti su postignuti u dodatkom natrijum sulfata u dvofazni sistem u odnosu na amonijum sulfat, što je verovatno bilo posledica selektivnije raspodele proteina, odgovornih za aktivnost, u gornju fazu sistema, kada su u njemu bili prisutni joni natrijuma i sulfata.

Kako eventualni uticaj fosfata na raspodelu proteina podrazumeva, kako efekt njegove koncentracije, tako i pH vrednosti, u eksperimentima u model sistemu, sastavljenom od polietilen glikola 4000 i sirovog dekstrana, je ispitano kako ove dve promenljive deluju na raspodelu pektinaza komercijalnog preparata. Praćenjem parametara raspodele u prisustvu fosfatnog pufera  $KH_2PO_4$ - $K_2HPO_4$  različitih pH vrednosti se utvrdilo da povećanje pH favorizuje raspodelu endo-p aktivnosti u gornju fazu sistema, uz adekvatan porast prinosa u njoj, pa su i najveće vrednosti dobijene na najvećim ispitivanom pH ( $K_{endo}$  0.9,  $Y_{endo}$  62.26%). Pozitivan trend su sa povećanjem pH imali i koeficijent raspodele i prinos egzo-p, ali samo do pH 7.0 ( $K_{egzo}$  0.76,  $Y_{egzo}$  56.76%), a pad vrednosti ovih parametara na pH 7.5 mogao se smatrati posledicom pH nestabilnosti ovog enzima. Najveći stepen prečišćenosti oba enzima postignut je na pH 7.0, što je verovatno bilo posledica najselektivnije raspodele proteina odgovornih za aktivnost u gornju fazu. Ispitivanje uticaja koncentracije fosfatnog pufera pri pH 7.0 pokazalo je da njeno povećanje favorizuje raspodelu endo-p u gornju fazu sistema, te su najveće vrednosti parametara, koji karakterišu ovaj fenomen, dobijene pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 0.4 mol/l ( $K_{endo}$  4.21,  $Y_{endo}$  85.78% i st.preč. 10). Ovakav efekt pripisan je stvaranjem kompleksa (gela) između fosfatnih anjona i dekstrana, koji istiskuju endo-p u gornju fazu. Prisustvo fosfata u model sistemu povećalo je udeo polietilen glikola u sistemu, pri kojoj se dobijaju najbolji rezultati raspodele oba tipa pektinaza, na 7.5% (w/w), u odnosu na sistem bez fosfata, u kome su najbolji rezultati dobijeni pri 5% (w/w).

U okviru ispitivanja uticaja soli na raspodelu pektinaza komercijalnog preparata u model sistemu, određen je uticaj natrijum hlorida, kao jedinjenja često obrađivanog u istraživanjima ove vrste. Dodatak natrijum hlorida u dvofazni sistem smanjio je koeficijente raspodele endo-p i egzo-p i njihove prinose i stepene prečišćenosti u gornjoj fazi u svim ispitivanim koncentracijama (5-37.5 mmol/l), što se može pripisati negativnom naelektrisanju pektinaza na ispitivanom pH 5.0.

Uzimajući u obzir rezultate ispitivanja raspodele pektinaza u model sistemima, potrebu za smanjenjem sadržaja polimera u podlozi, motivisanu ekonomskim razlozima i vrednošću viskoziteta, kao i činjenicu da je rast ćelija mikroorganizama optimalan u blizini binodalne krive, kultivacija *Polyporus squamosus* na pektinu u vodenom dvofaznom sistemu je izvedena u podlozi sa 5% (w/w) polietilen glikola 4000 i 4% (w/w) sirovog dekstrana. Koncentracija amonijum sulfata u podlozi je bila povećana za 15 mmol/l, u skladu sa rezultatima iz model sistema. Koeficijent raspodele pektina je bio 0.25, odnosno većina pektina se nalazila u donjoj



fazi sistema. Rast gljive se odvijao isključivo u donjoj fazi sistema, pri čemu je količina produkovane biomase bila 4.5, ukupne egzo-p aktivnosti 1.82 puta veća, a endo-p aktivnosti jednaka onoj u kontrolnom homogenom medijumu. Povećana produkcija egzo-p aktivnosti objašnjena je prisustvom polietilen glikola u medijumu, odnosno njegovom interakcijom sa površinom ćelije koja izaziva promenu permeabilnosti, uz pretpostavku da je ovaj enzim vezan za ćeliju, kao što je to slučaj kod nekih fungi. Ustanovljeno je da se vrednosti parametara raspodele menjaju tokom kultivacije, što je pripisano uticaju biomase i medijuma, kako u smislu potrošnje njegovih konstituenata, tako i proizvodnje metabolita, koji na raspodelu mogu uticati direktno ili kroz promenu ravnotežnih koncentracija polimera u fazama. Pri tome su, drugog dana kultivacije, ostvareni najpovoljniji parametri raspodele i za endo-p ( $K_{\text{endo}}$  2.45,  $Y$  80.22%, st.preč. 7) i za egzo-p ( $K_{\text{egzo}}$  0.6,  $Y$  gotovo 50%, st.preč. 5.19).

Kultivacija gljive *P. squamosus* je bila moguća i u dvofaznom sistemu sastavljenom od polietilen glikola 4000 i dekstrana 40000, uz raspodelu biomase u donju fazu sistema, ali se sistem sa sirovim dekstranom, po količini produkovane aktivnosti i parametrima raspodele, pokazao kao bolji izbor.

Ispitivanje uticaja amonijum sulfata tokom kultivacije *P. squamosus* u dvofaznom sistemu, sastava 5% (w/w) polietilen glikol 4000/ 4% sirovi dekstran, na raspodelu pektinaza, pokazalo je da je povećana koncentracija ove soli u medijumu (za 15 mmol/l) trećeg dana kultivacije izazvala povećanje koeficijenta raspodele endo-p za 81%, vrednosti ove aktivnosti u gornjoj fazi za 37%, a da nije uticala na raspodelu biomase. Pod istim uslovima, aktivnost egzo-p u gornjoj fazi je bila 1.8 puta veća, dok je stepen prečišćenosti bio veći za 20%.

Pri ispitivanjima koncentracijama fosfata od 0.1 do 0.2 mol/l rast *P. squamosus* se odvijao isključivo u donjoj fazi sistema 5% (w/w) polietilen glikol 4000/ 4% (w/w) sirovi dekstran, a pri 0.2 mol/l fosfata ostvareno je njeno idalno razdvajanje od endo-p, uz koeficijent raspodele egzo-p, koji je iznosio 1.12. Najveća količina produkovanih aktivnosti endo i egzo tipa (21.04 U, odnosno 5282.04 U) ostvarena je pri 0.1 mol/l fosfata, uz visoke vrednosti koeficijenata raspodele (3.9 za endo-p, odnosno 0.95 za egzo-p) i najveće stepene prečišćenosti ovih enzima (5.89, odnosno 14.36) u gornjoj fazi sistema. Više vrednosti koncentracije fosfata (iznad 0.2 mol/l) činile su medijum viskoznim, i kao takvim, nepodesnim za rast ćelija, koje produkuju enzime.

Utvrđeno je da povećanje početnog pH dvofaznog medijuma sa vrednosti 5.0 na 7.0 poboljšava raspodelu egzo-p aktivnosti u gornju fazu, izraženu kroz koeficijent raspodele i prinos, kao i stepen prečišćenosti, ali je ukupna produkovana aktivnost ovog tipa bila manja.

Kultivacija *Polyporus squamosus* je bila ostvarena i u vodenom dvofaznom sistemu koji je sadržao suve izlužene repine rezance. Sadržaj polimera je uticao na morfologiju rasta, tako da je ona pri nižim vrednostima udela polimera (5% (w/w) polietilen glikol/ 4% (w/w) sirovi dekstran) imala odlike micelarnog, dok je rast u prisustvu veće količine polimera (po 7.5% (w/w) oba) bio u formi peleta. Iako je raspodela endo-p aktivnosti u sistemu sa većim sadržajem polimera pokazivala karakteristike idalne, ukupna produkovana aktivnost oba tipa pektinaza je bila manja. Praćenjem raspodele pektinaza u sistemu sa 1.5% suvih izluženih repinih rezanaca, sastava 5% (w/w) polietilen glikol/ 4% (w/w) sirovi dekstran, utvrđeno je da su postignuti parametri raspodele trećeg dana kultivacije bili najpovoljniji, kako za endo-p ( $K_{\text{endo}}$  4.70,  $Y_{\text{endo}}$  90.71%, st.preč. 4.26), tako i za egzo-p ( $K_{\text{egzo}}$  2.78,  $Y_{\text{egzo}}$  85.24%, st.preč.

7.98), dok je rast biomase bio ograničen u donjoj fazi sistema. Prisustvo izluženih repinih rezanaca, kao čvrste materije, nije nepovoljno uticalo na parametre raspodele pektinaza *P. squamosus*.

Poglavlje **ZAKLJUČAK** sadrži sumarni pregled realizacije postavljenih ciljeva, odnosno pregled zaključaka, koji proizilaze iz rezultata rada na problematici ove doktorske disertacije.

## ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu izloženog Komisija zaključuje da rezultati, do kojih je kandidat mr Mirjana G. Antov došla u svojim istraživanjima, predstavljaju originalan i značajan doprinos izučavanju raspodele enzima u vodenim dvofaznim sistemima, pri čemu treba istaći da je ovo prvo istraživanje raspodele pektinaza u ovakvim sistemima. Istraživanje produkcije i raspodele pektinaza u dvofaznim kultivacionim sistemima, uz istovremenu separaciju biomase, poznate kao proteinski vredne, pruža mogućnost primene rezultata ove disertacije i u praksi. Kandidat je pokazao zavidan nivo u naučnom pristupu istraživanjima, obradi rezultata i njihovom prikazivanju i diskusiji.

Imajući ovo u vidu, Komisija **pozitivno** ocenjuje doktorsku disertaciju kandidata mr Mirjane Antov, asistenta Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, pod nazivom "**RASPODELA PEKTINAZA U VODENIM DVOFAZNYM SISTEMIMA**" i predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu da prihvati ovu ocenu, odredi datum i pozove kandidata na usmenu javnu odbranu.

## KOMISIJA

1. Dr Suzana Petrović, red.prof.  
Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,  
predsednik

2. Dr Draginja Peričin, red.prof.  
Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,  
mentor, član

3. Dr Slavko Kevrešan, red. prof.  
Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu  
član