

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

Датум: 25.03.2017.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Ане Калушевић, дипл.инж.

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 461/4-5.3 од 25.01.2017. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: »Микроинкапсулација биоактивних једињења из споредних производа прехранбене индустрије», кандидаткиње Ане Калушевић, дипл. инж. Комисија на основу детаљно проучене завршене докторске дисертације подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Ане Калушевић, написана је на 227 страна, у оквиру којих се налази 36 табела и 67 слика. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику. Докторска дисертација садржи седам поглавља, и то: Увод (стр. 1 - 3), Теоријски део (стр. 4 - 64), Циљеви истраживања (стр. 65 - 66), Материјали и методе (стр. 67- 92), Резултати и Дискусија (стр. 93 - 181), Закључак (стр. 182 - 186) и Литература (стр. 187 - 221). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата, прилози и обавезне изјаве (стр. 222 - 227). Поглавља Теоријски део, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У овом поглављу истакнут је значај искоришћења споредних производа прехранбене индустрије, екстракције биоактивних једињења, као и процеса инкапсулације истих у сврху примене у прехранбеној индустрији и биотехнологији. Посебан осврт је на дат микроинкапсулацији екстраката биоактивних једињења екстрахованих из споредних производа. Кандидаткиња је истакла потребу увођења микроинкапсулације природних пигмената изолованих из споредних производа као начина заштите осетљивих једињења. Наглашено је да се процесом микроинкапсулације може постићи пре свега формирање микроинкапсулата екстракта антоцијана у жељеној форми, величини и физичко-хемијских својстава. Кандидаткиња је указала на могућности примене различитих техника инкапсулације у циљу заштите екстраката биоактивних једињења.

Теоријски део. Кандидаткиња је у овом поглављу приказала доступне литературне податке из области која је предмет проучавања ове докторске дисертације. Ради прегледности, а узимајући у обзир својства материјала коришћених у раду ово поглавље је подељено у потпоглавља. Прво потпоглавље *Споредни производи прехранбене индустрије*

даје приказ стања у свету на тему како настајања, тако и искорошћења споредних производа у различите сврхе. Детаљно су описане сировине коришћене у дисертацији тј. грозђе црних сорти, односно покожица грозђа и црна соја, односно семењача соје. Друго потпоглавље *Фенолна једињења споредних производа прехранбене индустрије* даје систематичан преглед свих фенолних једињења, њихових хемијских и биолошких својстава, са акцентом на оним групама једињења који се налазе у споредним производима која су била предмет испитивања ове дисертације. У потпоглављу *Екстракција биоактивних једињења споредних производа* дат је приказ резултата доступних литературних података о екстракцији биоактивних једињења, пре свега фенолних једињења и антоцијана различитим поступцима екстракције. У потпоглављу *Инкапсулација* истиче се предност употребе овог процеса, нарочито ради заштите осетљивих једињења. Дат је преглед предности и недостатака различитих техника инкапсулације и материјала коришћених као носача. На бази доступне литературе су дати основни, али и актуелни подаци везани за како процес екстракције, тако и инкапсулације биоактивних једињења споредних производа (са нагласком на покожици црних сорти грозђа и семењачи црне соје). У посебним деловима потпоглавља кандидаткиња је дала приказ литературних података везаних за материјале који се користе као носачи активних компоненти, технике инкапсулације, као и примере њихове примене у прехранбеној производњи. Приказани литературни подаци указују да постоји основа за оптимизацијом наведених поступака и испитивање адекватних материјала у процесима инкапсулације биоактивних једињења изолованих из споредних производа у циљу њихове стабилизације и примене.

Циљеви истраживања. Дефинисани су основни циљеви дисертације: 1. Оптимизација екстракције биоактивних једињења (фенолних једињења, антоцијана) из покожица црних сорти грозђа и семењаче црне соје као споредних производа прехранбене индустрије у циљу њиховог искоришћења. У ту сврху испитивани су утицаји различитих фактора на екстракцију попут: растварача, додатка киселина, додаток адекватних ензима, примене ултразвучних таласа различитих фреквенција, различитих односа чврсте и течне фазе и сл. 2. Микроинкапсулација екстракта биоактивних једињења са различитим материјалима као носачима у циљу њихове стабилизације. Испитиван је утицај спреј сушења и лиофилизације као техника микроинкапсулације и утицај малтодектрина, арапске гуме и млека у праху као носача активних компонената. 3. Карактеризација микроинкапсулата добијених помоћу три носача и две технике микроинкапсулације. Испитиван је утицај поменутих фактора на морфологију микроинкапсулата, основне физичке и хемијске карактеристике, садржај биоактивних једињења и антиоксидативни капацитет, стабилност боје, антимикробну активност и сл. 4. Приказ потенцијалне примене добијених микроинкапсулата у прехранбеним производима.

Материјали и методе. Кандидаткиња је дала детаљан приказ примењених техника екстракције и микроинкапсулације, као и метода које су коришћене за анализу добијених екстракта и микроинкапсулата. У циљу прегледности, ово поглавље је подељено у два потпоглавља *Материјали* и *Методе*. У делу *Материјали* набројане су све коришћене хемикалије и њихови произвођачи, као и сировине коришћене у раду са знаком произвођача истих. Конкретно, кандидаткиња је за испитивања користила грозђе три црне сорте (прокупац, *cabernet sauvignon*, *pinot noir* (бургундац црни)) уступљене од стране Огледног добра Пољопривредног факултета Радмиловац (Србија) и винарије Чокот (Србија), док је црна соја (сорте *black tokyo*) материјал Института за кукуруз Земун Поље

(Србија). Потпоглавље *Методe* је подељено на осам мањих делова. На почетку овог дела кандидаткиња је приказала детаље поступака екстракције и микроинкапсулације помоћу спреј сушења и лиофилизације, као и примене микроинкапсулата добијених помоћу малтодекстрина, арапске гуме и млека у праху. Процес екстракције биоактивних једињења, која су представљала активну компоненту микроинкапсулата, оптимизован је у погледу различитих третмана, времена екстракције, ефикасности растварача, односа чврсте и течне фазе, примене ултразвучних таласа различите фреквенције итд. Оптимизованим течним екстрактима је одређиван садржај укупних фенолних једињења (методом по *Folin-Ciocolteu*), укупних антоцијана (спектрофотометријским методама) и садржај индивидуалних антоцијана, хроматографском анализом коришћењем стандарда шест најчешћих антоцијана у полазним сировинама (HPLC, ThermoScientific Ultimate3000, САД). Екстрактима је одређиван садржај макроелемената (Са, Р, К, Mg, Na) и елемената у траговима, њих 25 (детекцијом помоћу ICP-MS, Perkin Elmer SCIEX, Канада). Поред тога, дефинисана им је боја, као и њена стабилност након периода складиштења у одређеним условима. Одређивање боје како екстраката, тако и микроинкапсулата извршено је ручним хромаметром CR-410 (Minolta, САД), са извором светлости D₆₅. Такође, испитани су антиоксидативни капацитети узорака спектрофотометријским методама (DPPH, ABTS, FRAP, QUENCHER_{ABTS}) и електрохемијском методом (поларографска НРМС метода). Антимикробна активност екстраката биоактивних једињења, а затим и њихових микроинкапсулата испитивана је на раст и развој следећих патогених микроорганизама: *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Bacillus spizizeni* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27299, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150 и *Candida albicans* ATCC 10259 и то микродилуционом методом са микротитарским плочицама. Морфологија микроинкапсулата испитивана је помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM, Jeol, Јапан), на основу које је одређиван и просечни пречник микроинкапсулата, као и њихова дистрибуција. Анализе FTIR спектра екстраката, носача и микроинкапсулата (ATR-FTIR, Shimadzu, Јапан) вршене су у циљу испитивања интеракција између активне компоненте и носача. У исте сврхе вршена је и термичка анализа узорака диференцијално скенирајућом калориметријом (DSC, Mettler-Toledo, Швајцарска). Друге физичко-хемијске методе примењене су ради дефинисања активности воде, насипне и тапкане густине, компресибилности и растворљивости микроинкапсулата. Садржај укупних фенолних једињења, укупних и индивидуалних антоцијана и антиоксидативни капацитети микроинкапсулата одређивани су истим методама као и код екстракта покожице грожђа и семењаче соје. Отпуштање/ослобађање биоактивних једињења из микроинкапсулата испитивано је у медијумима различитих рН вредности (које симулирају рН вредности течности гастроинтестиналног тракта) и воде, температуре 37 °С, на уређају са проточним ћелијама (CE7Smart, САД). Прехрамбени производи којима су додати микроинкапсулати као природне боје су сензорно оцењивани методом рангирања и хедонске скале са оценама од 1 до 9. Такође, испитана је могућност коришћења микроинкапсулата као додатка у производњи прехрамбених филмова. Статистичка обрада података обављена је применом статистичког програма STATISTICA 12 (Stat-Soft, Inc., САД), а избор статистичких метода је обављен на основу врсте и хомогености конкретних података, односно резултата анализа. Статичка значајност разлика аритметичких средина је утврђивана на нивоу значајности $p < 0,05$. Одступање од нормалне расподеле је вршено преко дескриптивних тестова нормалности.

Резултати и дискусија. Резултати су документовани прегледним табелама и графичким приказима и продискутовани концизно и јасно. Ово поглавље је подељено у две целине, прву чине резултати који се односе на оптимизацију екстракције биоактивних једињења из споредних производа, док другу чине резултати везани за оптимизацију микроинкапсулације тих екстраката. Резултати су на адекватан начин упоређени са резултатима сличних истраживања. У првом потпоглављу *Оптимизација екстракције и карактеризација екстраката* графички су приказане кинетике екстракције фенолних једињења и антоцијана, а затим табеларно утицај сваког испитиваног фактора на ефикасност екстракције, као и утицај на присутна биоактивна једињења, а пре свега њихову антиоксидативну активност. Као најефикаснији поступак екстракције биоактивних једињења из обе коришћене сировине показала се примена 70% V/V етанола као растварача и примена ултразвучних таласа фреквенције 40 kHz. У случају семењаче црне соје, ефикасност екстракције биоактивних једињења повећана је већим односом чврсте и течне фазе (1:40) и додатком лимунске киселине растварачу (1% m/V). Стандардне криве за све употребљене методе за одређивање поменутих биоактивних једињења, као антиоксидативни капацитет дате су у прилогу I. Садржај екстрахованих антоцијана из покожице грожђа био је просечно 16,3 mg CGE/g_{см}, а из семењаче соје просечно 10,6 mg CGE/g_{см}. Течно-хроматографска анализа потврдила је да је малвидин-3-глукозид доминантно присутан антоцијан у екстракту из покожице грожђа (800-850 mg/L), док је код семењаче соје то био цијанидин-3-глукозид (300-320 mg/L). Хроматограми добијени помоћу HPLC анализе приказани су у Прилогу II. У оквиру овог потпоглавља утврђен је садржај макроелемената и елемената у траговима у оба екстракта која су представљала активне компоненте у микроинкапсулатима. Калијум је међу испитиваним елементима био присутан у највишој концентрацији у обе врсте екстракта. У другом потпоглављу *Оптимизација микроинкапсулације и карактеризација микроинкапсулата* изложени су резултати микроинкапсулације за сва три коришћена носача (малтодекстрин, арапска гума, млеко у праху) и обе примењене технике (спреј сушења и лиофилизација) за добијање микроинкапсулата. Спреј сушењем су добијене сферне честице, сем у случају млека у праху као носача код кога су микроинкапсулати неправилног облика. Просечни пречник микроинкапсулата био је 3-5 μm без утицаја примењеног носача. Леофилизацијом су добијени микроинкапсулати неуниформног облика и структуре типичне за инкапсулате добијене овом техником. У односу на слободне форме, микроинкапсулисане активне компоненте показале су већу стабилност у процесима који подразумевају примену повишених температура (до око 200 °C), што је потврђено анализом узорака на диференцијално скенирајућем калориметру. Добијени микроинкапсулати су показали добра физичка својства попут насипне и тапкане густине, проточности и компресибилности. Сви испитивани микроинкапсулати су показали изузетно ниске вредности активности воде (0,2-0,3), а они добијени спреј сушењем и веома високу растворљивост (око 90% m/m). Принос микроинкапсулата је варирао од 63,7 до 92,8%. Садржај укупних фенолних једињења у микроинкапсулатима се кретао од 5,81 до 11,57 mg GAE/g и био највиши код микроинкапсулата на бази арапске гуме добијених лиофилизацијом. У узорцима са овим носачем садржај укупних антоцијана је био најнижи, испод 2 mg CGE/g у случају семењаче црне соје као извора, а највиши садржај у микроинкапсулатима екстракта покожице грожђа на бази малтодекстрина добијених спреј сушењем (око 5 mg CGE/g). Течно-хроматографском анализом идентификовани су и квантификовани доминантни антоцијани (малвидин-3-глукозид у покожици грожђа и

цијанидин-3-глукозид у семењачи соје). Одређивање антиоксидативног капацитета је показало предности млека у праху и арапске гуме као носача у микроинкапсулатима у односу на оне на бази малтодекстрина, а ти закључци су потврђени и електрохемијским мерењем поларографијом. Добијени резултати су подвргнути трофакторијалној статистичкој анализи дискутујући утицај примењене сировине (извора биоактивних једињења), технике инкапсулације и носача. Антоцијани су поред високог антиоксидативног потенцијала допринели пожељној боји микроинкапсулата, што омогућава још разноврснију потенцијалну примену микроинкапсулата као природних боја (бојених материја) у прехранбеним производима. Боја као физичка и сензорна карактеристика екстракта и микроинкапсулата је окарактерисана употребом хромаметра, пре и после складиштења у трајању од шест месеци у адекватним условима, при чему је утврђена њихова изузетно висока стабилност у микроинкапсулисаној форми ($\Delta E=0,59-5,22$). Отпуштање/ослобађање активних компоненти из микроинкапсулата, са различитим носачима, временски је варирало у различитим медијумима, што се објашњава основним саставом микроинкапсулата, структуром и присутним хемијским везама потврђеним инфрацрвеном спектроскопијом. Добијени профили отпуштања/ослобађања антоцијана из микроинкапсулата у води и медијумима различите рН вредности указали су да микроинкапсулати са арапском гумом показују најспорије, а са малтодекстрином најбрже отпуштање активне компоненте. Ови резултати указују на могућност примене тих носача у зависности од планиране/жељене врсте финалних производа у које би се микроинкапсулати додавали. Сензорна анализа производа са додатком микроинкапсулата указала је да највећи потенцијал за примену у прехранбеним производима имају микроинкапсулати добијени помоћу малтодекстрина као носача. Прехранбени филмови са микроинкапсулатима су показали визуелно уочљиве промене при променама рН вредности производа, што пружа могућност за њихово коришћење у паковању различитих прехранбених производа. На крају овог потпоглавља кандидаткиња је дала техно-економску анализа производње природних боја поредећи примену различитих сировина и техника инкапсулације.

Закључак. У овом поглављу кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније закључке до којих је дошла на основу експерименталних истраживања. Општи закључак наведених истраживања и добијених резултата указује на оправданост искоришћења споредних производа прехранбене индустрије која су одабрана као предмет испитивања. Када је реч о екстракцији биоактивних једињења из споредних производа, кандидаткиња је извела закључке истичући поступке којима се добијају екстракти са високим садржајем антоцијана и фенолних једињења, као и антиоксидативним капацитетом. Један од генералних закључака је да се са додатком носача оптимизованим екстрактима биоактивних једињења из покожице грожђа или семењаче соје добијају микроинкапсулати пожељних физичко-хемијских карактеристика, независно од примењене технике инкапсулације. Као носачи коришћени су малтодекстрин, арапска гума и млеко у праху, материјали који су доступни и имају веома широку примену у прехранбеној индустрији. Закључено је да је малтодекстрин показао најбољи ефекат на морфологију и физичке карактеристике микроинкапсулата. Арапска гума је имала највећи ефекат на униформност микроинкапсулата и на њихов антиоксидативни капацитет. Као посебан закључак кандидаткиња је истакла утицај овог носача на спорије отпуштање антоцијана из микроинкапсулата у медијумима са различитим рН вредностима (симулација услова у течностима гастроинтестиналног тракта). Млеко у праху се показао као носач

микроинкапсулата са најмањом растворљивошћу, највишим антиоксидативним капацитетом и са уоченим новоформираним хемијским везама потврђеним FTIR анализом. Захваљујући DSC анализама закључено је да сви испитивани микроинкапсулати показују термичку стабилност у температурном опсегу важном за процесе у прехранбеној производњи. Истакнуто је да је промена боја током шестомесечног складиштења статистички незначајна, а сви испитивани микроинкапсулати показали су стабилност и потенцијал за њихову употребу као природне прехранбене боје. Техно-економском анализом закључено је да је за производњу природних боја најприхватљивије коришћење покожице грождја као сировине и спреј сушења као технике инкапсулације.

Литература. У дисертацији је наведено 344 референце које представљају актуелан избор и преглед најзначајнијих радова објављених у области прераде споредних производа прехранбене индустрије, екстракције и инкапсулације, а посебно из уже области, микроинкапсулације биоактивних једињења. У листи коришћене литературе доминирају радови објављени у међународним научним часописима и то новијег датума.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дипл. инж. Ане Калусевић под насловом „Микроинкапсулација биоактивних једињења из споредних производа прехранбене индустрије“ представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са планом предвиђеним пријавом дисертације. Кандидаткиња је детаљно проучила и систематски представила резултате истраживања других аутора у области екстракције и инкапсулације биоактивних једињења из различитих споредних производа прехранбене индустрије, дефинисала предмет испитивања и поставила научне циљеве, обавила експериментални део и применила адекватне методе за тумачење добијених резултата. Истраживања која су била предмет ове тезе су дала резултате који пружају нова сазнања у области микроинкапсулације прехранбених адитива, конкретно природних боја. Прехранбени адитиви, а пре свега боје представљају значајне компоненте прехранбених производа, пре свега са аспекта сензорних и нутритивних својстава производа. Резултати истраживања која су реализована у склопу ове дисертације су показала да се техникама микроинкапсулације екстраката из споредних производа прехранбене индустрије и уз примену адекватних носача могу добити микроинкапсулати који додатно побољшавају, пре свега, физичко-хемијска својства активних компонената екстраката. Кандидаткиња је показала да се применом наведених техника инкапсулације, спреј сушења и лиофилизације, могу добити микроинкапсулати с карактеристикама пожељним за примену у прехранбеној индустрији. Поред тога, резултати истраживања који су приказани у овом раду су показали да је могуће добијене микроинкапсулате применити у различите прехранбене производе, као и у прехранбене филмове. У раду су коришћени материјали носача који су прихватљиви са аспекта прехранбене технологије, доступни и са широком применом у различитим областима. Резултати остварени у овом раду допринеће бољем разумевању искоришћења споредних производа прехранбене индустрије, издвајања биоактивних једињења, процеса њихове микроинкапсулације и примене у прехранбеним производима.

На основу свега изнетог, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње Ане Калусевић, дипл. инж. под насловом „Микроинкапсулација биоактивних једињења из споредних производа прехранбене индустрије" и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да усвоји ову позитивну оцену и омогући кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације.

У Београду,
25.03.2017.

Чланови комисије:

др Виктор Недовић, редовни професор
Ужа научна област: Биохемија; Наука о врењу
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Ида Лескошек-Чукаловић, редовни професор
Ужа научна област: Наука о врењу
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Слађана Жилић, научни саветник
Ужа научна област: Прехрамбено инжењерство
Институт за кукуруз Земун Поље

др Јела Милић, редовни професор
Ужа научна област: Фармацеутска технологија
Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

др Бранко Бугарски, редовни професор
Ужа научна област: Хемијско инжењерство
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

др Стева Левић, доцент
Ужа научна област: Биохемија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Прилог

Рад дипл. инж. Ане Калушевић објављен у научном часопису на SCI листи

Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Kalušević, A., Špoljarić, I., Đorđević, V., Komes, D., Mršić, G., Nedović, V. (2015): Efficiency Assessment of Natural Biopolymers as Encapsulants of Green Tea (*Camellia sinensis L.*) Bioactive Compounds by Spray Drying. Food and Bioprocess Technology 8: 2444-2460.