

ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
кандидата Јадранке Фрај, дипл. инж. технологије

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и орган који је именовео комисију 9.9.2016. године, Наставно- научно веће Технолошког факултета Нови Сад
2. Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: <ol style="list-style-type: none">1. Др Јарослав Катона, доцент, Технолошко-инжењерске хемије, изабран 12.07.2012. године, Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад, председник комисије;2. Др Лидија Петровић, ванредни професор, Фармацеутско инжењерство, изабрана 21.04.2016. године, Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад, ментор;3. Др Марија Приморац, редовни професор, Фармацеутска технологија, изабрана 28.12.2004. године, Фармацеутски факултет Универзитета у Београду, члан.
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Јадранка (Лука) Фрај
2. Датум рођења, општина, држава: 30.07.1982. године, Љубовија, Република Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Технолошки факултет Нови Сад, Фармацеутско инжењерство, дипломирани инжењер технологије; Технолошки факултет Нови Сад, Контрола квалитета, дипломирани инжењер технологије-мастер
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2007. године, Фармацеутско-технолошке науке
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране:
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Примена протеин-полимер интеракције за формирање микрокапула са контролисаним отпуштањем активне супстанце

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација се састоји се из 7 поглавља, написаних на 134 стране А4 формата, са 7 табела и 58 слика. Кључна документација са изводом на српском и енглеском језику дата је на почетку докторске дисертације.

Списак поглавља:

1. **Увод** (стр. 1-3)
2. **Теоријски део са прегледом литературе** (стр. 4-48, 17 слика и 2 табеле)
3. **Експериментални део** (стр. 49-60, 5 слика и 1 табела)
4. **Резултати и дискусија** (стр. 61-108, 30 слика и 4 табеле)
5. **Закључци** (стр. 109-113)
6. **Литература** (стр. 114-132)
7. **Прилог** (стр. 133-135, 6 слика)

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

У **уводном делу** докторске дисертације указано је на актуелност проблематике којом се она бави, са јасно истакнутим циљем истраживања. Истакнут је значај носача активних материја у формулацијама различитих производа, пре свега прехранбене и фармацеутске индустрије, са посебним акцентом на носаче за истовремено инкорпорирање хидросолубилних и липосолубилних активних супстанци. Указано је на значај добијања стабилних дуплих емулзија воде у уљу у води (В/У/В), унутар којих би се инкорпирале различите активне супстанце. Истакнута је и актуелност замене нискомолекуларних емулгатора, који се користе за стабилизацију дисперзних система, биополимерима, као и значај изучавања интеракција између биополимера у циљу добијања стабилних омогача микрокапсула.

Поглавље **Теоријски део са прегледом литературе** састоји се из десет целина, у којима се на основу обимне литературе, даје систематичан преглед досадашњих научних сазнања у области која је предмет докторске дисертације. У овом делу су дате теоријске основе о понашању полимера у раствору, са посебним акцентом на протеине, као посебне групе полимера са одређеним специфичностима. Обрађене су интеракције између биополимера у раствору, наведени основни типови, и дате теоријске основе механизма интеракција. Детаљно су објашњени и механизми коацервације у растворима полимера, са посебним освртом на њен практични значај. Посебно су обрађене интеракције у смешама протеина, о којима постоји мали број научних публикација, што указује на изузетан теоријски и практичан значај истраживања у овој области.

Дупле емулзије, као носачи хидросолубилних и липосолубилних активних материја, имају велики потенцијал примене, како у прехранбеним, тако и у фармацеутским производима. У овом делу докторске дисертације дате су теоријске основе формирања ових система, механизми њихове нестабилности, као и до сада познати начини повећања стабилности и контролисања отпуштања инкорпорираних активних материја. Детаљно су обрађене физичко-хемијске особине желатина и натријум казеината, биополимера коришћених у експерименталном делу ове докторске дисертације, са посебним нагласком на особине захваљујући којима се примењују као стабилизатори дисперзних система. У оквиру посебних целина дате су и особине липофилних емулгатора из групе полиглицерол естара масних киселина, погодних за стабилизацију емулзија вода у уљу (В/У). Дат је опсежан литературни преглед савремених поступака микрокапсулације, са нагласком на микрокапсулацију методом коацервације, као и преглед метода карактеризације добијених микрокапсула (тип микрокапсула, величина честица, механичка отпорност, отпуштање инкапсулираног садржаја). На основу прегледа литературе разјашњен је механизам умрежавања протеина генипином, који се због своје нешкодљивости и природног порекла, последњих година све више користи у прехранбеним производима. Истакнуте су најзначајније особине и утицај на људско здравље витамина Ц и Е, који су, као активне материје, инкорпорирани у дупле В/У/В емулзије.

Поглавље **Експериментални део** садржи карактеристике материјала и детаљан опис уређаја и експерименталних процедура које су примењене за реализацију постављених циљева. Најпре су описани поступци припреме раствора полимера и емулгатора, као и поступак мерења рН вредности. У оквиру наредних целина детаљно су описане методе коришћене за испитивање интеракција у систему два протеина, као што су мерење мутноће, вискозиметријска и тензиометријска мерења, мерење зета потенцијала и реолошких карактеристика. Затим су описани поступци припреме емулзија, примарних В/У и дуплих В/У/В, као и методе испитивања њихових особина, седиментационе стабилности и величине и расподеле величина капи. У наредном сегменту описан је поступак формирања микрокапсула и њиховог издвајања из раствора применом *spray drying*

поступка. Описани су поступци карактеризација микрокапсула, испитивање морфологије површине применом електронске микроскопије, ефикасности инкапсулације витамина Ц и Е њиховом екстракцијом из микрокапсула и спектрофотометријским одређивањем концентрације витамина, као и *in vitro* испитивање ослобађања витамина Ц из микрокапсула применом уређаја за испитивање брзине растварања са ротирајућом лопатицом (*dissolution tester*). У последњем сегменту овог поглавља описан је поступак испитивања кинетике ослобађања витамина Ц из микрокапсула применом модел зависног поступка, односно фитовањем експерименталних података математичким моделима. Коришћени су следећи модели: *Higuchi* модел, кинетика нултог реда, кинетика првог реда и *Korsmeyer-Peppas* модел.

У делу **Резултати и дискусија** јасно и прегледно су приказани добијени резултати који су разложно дискутавани. Због прегледности, ово поглавље је систематизовано у четири целине.

У првом делу овог поглавља приказани су резултати испитивања интеракција између желатина и натријум казеината. Мерењем рН вредности смеша ова два протеина, утврђено је да су у области испитиваних концентрација они супротно наелектрисани, а визуелним посматрањем уочене су значајне разлике у хомогености ових смеша, што је потврђено и мерењем мутноће. Утврђено је да при масеном односу желатин:натријум казеинат од 2:1 долази до издвајања електро-неутралног коацервата на дну, што је потврђено и мерењем зета потенцијала. Вискозиметријска и тензиометријска мерења су показала да, као последица интеракција у систему, долази до значајних промена како у раствору, тако и на граници фаза. Реолошким мерењима утврђене су промене у структури, као и вискоеластичне особине смеша желатин/натријум казеинат.

Друга целина експерименталног рада односила се на испитивање могућности добијања стабилних примарних емулзија В/У. У ту сврху је најпре испитан утицај врсте и концентрације емулгатора, појединачних и у смешама, на међуповршински напон на граници фаза уље/вода. Коришћени емулгатори су полиглицерол полирицинолеат (ПГПР) и емулгатори из групе Caprol-a (Caprol 10G100, Caprol ET i Caprol 3GS). На основу резултата ових мерења одабране су серије смеша емулгатора за припрему емулзија. Масени односи ПГПР:Caprol 10G100 у смешама су били 1:0; 1:1; 1:2; 1:5; 1:10, а укупне концентрације емулгатора 1; 2 и 3% (м/в). Одређивањем величине и расподеле величина капи емулзија утврђено је да све емулзије имају капи са пречницима мањим од 280 nm, као и да са смањењем укупне концентрације емулгатора и повећањем удела Caprol-a 10G100 у смеши долази до повећања пречника капи. Ови резултати су у складу и са резултатима праћења седиментационе стабилности, где су највећу стабилност показале емулзије са концентрацијом емулгатора од 3% (м/в) и већим уделом ПГПР-а у смеши. С обзиром да ће се као активне материје користити витамини Ц и Е, испитан је њихов утицај на особине емулзија.

У наредној фази експерименталног рада испитан је утицај концентрације и врсте липофилних емулгатора, у примарним емулзијама, као и интеракције између желатина и натријум казеината на особине дуплих В/У/В. Резултати ових испитивања су показали да се емулзије В/У/В задовољавајуће стабилности добијају при концентрацији липофилног емулгатора од 3% (м/в) и масеним односима ПГПР:Caprol 10G100 од 1:0 и 1:1. Такође, утврђено је да интеракција између желатина и натријум казеината у континуалној фази дуплих емулзија има значајан утицај на њихове особине.

Завршна фаза експерименталног рада односила се на формирање микрокапсула и њихову карактеризацију. Умрежавањем комплекса протеина на спољашњој граници фаза помоћу генипина, добијене су микрокапсуле, које су из раствора издвојене распршивањем у струји топлог ваздуха (*spray drying* поступак). Карактеризација микрокапсула обухватила је испитивање морфологије површине, као и ефикасности инкапсулације витамина Ц и Е и кинетике отпуштања витамина Ц у *in vitro* условима, у зависности од концентрације генипина и области интеракције између желатина и натријум казеината. Применом модел зависне анализе дефинисани су механизми отпуштања витамина Ц из микрокапсула.

У поглављу **Закључци**, резултати истраживања су разложно и јасно сумирани и формулисани у 19 тачака, чиме је једнозначно представљен научни допринос дисертације.

Поглавље **Литература** садржи 254 литературних навода, цитираних на јасан и правилан начин, Избор референци је актуелан и примерен тематици коју описује докторска дисертација.

У **Прилогу** су графички приказане криве расподеле величина капи примарних В/У и дуплих В/У/В емулзија, које нису приказане у делу Резултати и дискусија.

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

Радови проистекли из истраживања у оквиру рада на докторској дисертацији:

M21- Рад објављен у врхунском међународном часопису:

1. **Milanović Jadranka**, Petrović Lidija, Sovilj Verica, Katona Jaroslav, Complex coacervation in gelatin/sodium caseinate mixtures, *Food Hydrocolloids* 37 (2014) p. 196-202

M34- Рад саопштен на међународном скупу штампан у изводу:

1. **Milanović Jadranka**, Sovilj Verica, Petrović Lidija, Influence of surfactant type on oil/water interfacial tension, In: *Book of abstracts, 5th Alumni Meeting International Summer School*, Novi Sad (2011) p. 13
2. **Milanović Jadranka**, Sovilj Verica, Petrović Lidija, Surface and viscous properties of gelatin/ Na caseinate mixtures, In: *26th Conference of the European Colloid and Interface Society Book of Abstract*, Malmo&Lund (2012) p. P3: 65
3. **Milanović Jadranka**, Petrović Lidija, Katona Jaroslav., Njaradi Sandra, Marčeta Brankica, Properties of o/w emulsions stabilized by gelatin/NaCN mixtures, In: *Book of abstracts 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries - ICOSECS 8*, Belgrade (2013) p. 18
4. Petrović Lidija, **Milanović Jadranka**, Katona Jaroslav, Njaradi Sandra, Marčeta Brankica, Stabilization of w/o emulsions using polyglycerol esters as emulsifiers In: *Book of abstracts 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries - ICOSECS 8*, Belgrade (2013) p. 17
5. Petrović Lidija, **Fraj Jadranka**, Milinković Jelena, Katona Jaroslav, Bučko Sandra, Double W/O/W Emulsions Stabilized with Gelatin/Sodium Caseinate Mixtures as Carriers of Water Soluble and Oil Soluble Vitamins. In: *29th Conference of The European Colloid and Interface Society ECIS 2015*, Bordeaux (2015) p. 51(1)

M64- Рад саопштен на скупу националног значаја штампан у изводу:

1. Петровић Лидија, Совиљ Верица, **Милановић Јадранка**, Добијање емулзија воде у сунцокретовом уљу стабилованих различитим емулгаторима, 50. Саветовање СХД, 14-15 јун 2012. Београд, Изводи радова (2012) ХТМ П1: 136

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Посматрањем смеша желатин/натријум казеинат уочено је да при масеном односу желатина и натријум казеината од 2:1 долази до сепарације фаза и преципитације нерастворних комплекса. Утврђено је да интеракција између ова два протеина утиче на особине система, како у раствору, тако и на граници фаза. Мерењем зета потенцијала смеша желатин/натријум казеинат утврђено је да повећањем концентрације натријум казеината долази до смањења нето позитивног наелектрисања молекула желатина и формирања неутралног комплекса, при масеном односу од 2:1. Даље повећање концентрације натријум казеината доводи до повећања негативног наелектрисања комплекса и његовог растварања.

Утврђено је и да интеракција између желатина и натријум казеината утиче и на реолошке карактеристике система, јер криве протицања желатина и смеша желатин/натријум казеинат при концентрацијама пре формирања нерастворног коацервата показују тиксотропно понашање. Реолошке карактеристике коацервата нису могле бити одређене због његове компактне и лепљиве структуре, док је супернатант показивао класично њутновско протицање, указујући да је ова фаза чист растварач. Смеше са концентрацијама натријум казеината од 1,5 и 2% (м/м) показују знатно одступање од понашања гела желатина, док се при концентрацији натријум казеината од 3% (м/м) поново успоставља јака гел структура. Промене еластичног модула испитиваних смеша потпуно су у сагласним мерењима.

Поредећи утицај различитих липофилних емулгатора (Caprol 3GS, Caprol 10G100, Caprol ET i ППР) на вредност међуповршинског напона уље-вода уочено је да код емулгатора из групе Caprol-a са порастом ХЛБ броја долази до значајнијег снижења међуповршинског напона, али да највећи ефекат на снижење међуповршинског напона показује ППР. Испитивањем међуфазног понашања бинарних смеша емулгатора утврђено је да они синергистички делују једино у смеси ППР:Caprol 10G100 масеног односа 1:1, концентрације веће од 0,1% (м/в).

Повећање концентрације емулгатора и смањење удела Caprol-a 10G100 у смеси са ППР-ом позитивно утиче на смањење средњег пречника капи В/У емулзија и повећање њихове седиментационе стабилности. Резултати испитивања утицаја присуства витамина Ц и Е међуповршински напон и особине емулзија, указују да присуство витамина не омета адсорпцију емулгатора на границу фаза уље-вода, али да долази до незнатног повећања величина капи емулзија. На основу ових истраживања одабране су 20% емулзије В/У стабилизоване смешама ППР:Caprol 10G100, масених односа 1:0; 1:1 и 1:2, укупне концентрације 3% (м/в), са витаминима Ц (25% (м/в)) и Ц (1,6% (м/в)), као примарне емулзије за добијање дуплих, В/У/В емулзија.

Дисперговањем одабраних примарних емулзија у 1,7142% (м/м) желатину добијене су 30% В/У/В емулзије. Уочено је да повећањем удела Caprol-a 10G100 у смеси са ППР-ом, у уљној фази примарних емулзија, долази до благог повећања средњег пречника капи дуплих емулзија (са 11,12 на 13,45 μ m) као и смањења стабилности. Најстабилније емулзије добијајене су при масеном односу желатина и натријум казеината од 2:1, односно у условима формирања нерастворног коацервата који се депонује на капима емулзија, што указује на значајан утицај интеракције ова два протеина на особине емулзија. Све испитиване емулзије су показале седиментациону нестабилност већ у току првих 24 сата након припреме, која се са временом практично није мењала. Такође, ни код једног узорка емулзије није дошло до издвајања уљне фазе и разрушавања емулзије.

Умрежавањем помоћу генипина и издвајањем из раствора сушењем у струји топлог ваздуха добијене су микрокапсуле са инкорпорираним витаминима Ц и Е. Анализом морфологије површине уочено је да је највећи удео микрокапсула сферног облика, са благо набораном површином и порам реда величине до 100 nm. Суспендовањем у води није дошло до промене у морфологији омотача микрокапсула. Утврђено је да се повећањем концентрације генипина може постићи боља ефикасност микрокапсулације, при чему је она већа за витамин Ц.

Испитивањем кинетике отпуштања витамина Ц у *in vitro* условима и применом модел зависне анализе за дефинисање модела отпуштања, највеће вредности коефицијената корелације добијене су за *Korsmeyer-Peppas*-ов модел, што указује на његово ослобађање простом дифузијом. Уочено је да се са повећањем концентрације генипина брзина ослобађања витамина Ц смањује, услед формирања компактнијег омотача. На основу ових резултата одређена је оптимална концентрација генипина, за умрежавање комплекса желатин/натријум казеинат, која износи 2 mmola/g протеина. Највећа ефикасност инкапсулације витамина Ц и Е постиже се при концентрацији натријум казеината од 0,5% (м/м), односно у условима формирања нерастворног коацервата протеина. На ефикасност микрокапсулације има утицај и врста емулгатора коришћеног за стабилизацију примарних емулзија.

<p>Употребом 3% смеша ПГПР:Caprol 10G100, масеног односа 1:1, за стабилизацију примарне емулзије могуће је добити микрокапсуле са контролисаним ослобађањем витамина Ц (у току 60 мин) при концентрацијама натријум казеината од 0,01; 0,1 и 0,5% (м/м) у смеси са 1% (м/м) желатином, али је ефикасност инкапсулације највећа у условима формирања нерастворног коацервата. Када се примарна емулзија стабилизује чистим 3% (м/в) ПГПР-ом највећа вредност коефицијента корелације са <i>Korsmeyer-Peppas</i>-овим моделом се успоставља у условима формирања нерастворног коацервата, док се при вишим концентрацијама корелација благо нарушава и скраћује време ослобађања активне супстанце.</p>
<p>VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.</p>
<p>Резултати истраживања су добијени извођењем добро постављених експеримената, усклађених са дефинисаним циљевима докторске дисертације. Приказани су прегледно и јасно у табелама, графицима и на сликама. Дискусија добијених резултата заснована је на добром познавању научне литературе и поткрепљена одговарајућим литературним наводима, где је то било могуће.</p> <p>На основу наведеног, Комисија позитивно оцењује приказ и тумачење резултата истраживања.</p>
<p>IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ: Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:</p>
<p>1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме Да. Докторска дисертација написана је у потпуности у сагласности са образложењем наведеним у пријави теме доктората.</p>
<p>2. Да ли дисертација садржи све битне елементе Да. Докторска дисертација садржи све битне елементе.</p>
<p>3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци У докторској дисертацији, применом различитих метода, детаљно су испитане интеракције у систему два протеина, желатина и натријум казеината, о чему у доступној научној литератури има врло мало података. Оригиналноста дисертације огледа се, пре свега, у примени коацевата два протеина за стабилизацију дуплих емулзија В/У/В, као потенцијалних носача активних материја. Оптимизацијом услова добијања, која обухвата избор одговарајуће врсте и концентрације липофилног емулгатора за стабилизацију примарне В/У емулзије, као и области интеракције између желатина и натријум казеината у спољашњој континуалној фази у којој се формирају комплекс ова два протеина депонује на граничној површини, добијене су стабилне В/У/В емулзије са инкорпорираним витаминима Ц и Е. Примена генипина за умрежавање комплекса протеина на капима В/У/В емулзија, у циљу формирања микрокапсула, такође представља значајну новину и у складу је са савременим тенденцијама о примени природних умреживача у производима прехранбене и фармацеутске индустрије.</p>
<p>4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања Нема. Докторска дисертација нема недостатака.</p>

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију дипл. инж. Јадранке Фрај под називом: “Примена протеин-полимер интеракције за формирање микрокапула са контролисаним отпуштањем активне супстанце” и предлаже да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана.

НАВЕСТИ ИМЕ И ЗВАЊЕ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ
ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Др Јарослав Катона, доцент

Универзитет у Новом Саду Технолошки факултет
председник

Др Лидија Петровић, ванредни професор

Универзитет у Новом Саду Технолошки факултет
ментор

Др Марија Приморац, редовни професор

Универзитет у Београду Фармацеутски факултет
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.