

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ**

**ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**  
**Љиљана Поповић, дипл. инж.**

<b>I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ</b>
1. Датум и орган који је именовао комисију 10.02.2011. Наставно-научно веће Технолошког факултета у Новом Саду.
2. Састав комисије са назнаком 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:  1. др <b>Светлана Тривић</b> , ред. проф., ужа научна област Биохемија, изабрана 11.04.2002. год. и запослена на Природно-математичком факултету у Новом Саду. 2. др <b>Верица Совиљ</b> , ред. проф., ужа научна област Примењене и инжњерске хемије, изабрана 08.05.2001. год. и запослена на Технолошком факултету у Новом Саду. 3. др <b>Драгиња Перичин</b> , ред. проф., ужа научна област Примењене и инжењерске хемије, изабрана 15.06.1999. год. и запослена на Технолошком факултету у Новом Саду.
<b>II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ</b>
1. Име, име једног родитеља, презиме: Поповић (Милан) Љиљана
2. Датум рођења, општина, држава: 04.05.1978. Врбас, Општина Врбас, Република Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив: Технолошки факултет, Фармацеутско инжењерство, дипломирани инжењер технологије
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2007. Хемијско-технолошке науке
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: -
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -

<b>III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>
Изучавање функционалних својстава ензимски модификованих биљних глобулина
<b>IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>
Докторска дисертација садржи шест поглавља: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Увод (стр. 1-2);</li><li>2. Општи део (стр. 3-54);</li><li>3. Материјал и методе (стр. 55-63);</li><li>4. Резултати и дискусија (стр. 64-108);</li><li>5. Закључак (стр. 109-111);</li><li>6. Литература (стр. 112-140).</li></ol> Дисертација је написана на 140 страна, А4 формата, са 33 слике, 19 табеле и 328 литературна навода.
<b>V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:</b>
<p><b>Увод</b> указује на актуелна научна истраживања функционалних особина протеина. Дат је кратак опис ензимских поступака модификације протеина и њихове примене, чиме је указано на значај и актуелност теме дисертације. На крају увода дат је преглед предмета и циља истраживања у оквиру дисертације.</p> <p><b>Општи део</b> дисертације приказује најновија научна сазнања у испитиваној области и састоји се из три дела. У првом делу су презентована актуелна научна сазнања о протеинима биљака која се односе на њихову класификацију и изоловање. Детаљно је описана класа биљних глобулина, односно кукурбитина – главног резервног протеина семена уљане тикве (<i>Cucurbita pepo</i>). У другом делу, описане су функционалне особине протеина. Детаљно су приказане и класификоване на основу механизма деловања. У посебним подпоглављима описане су појединачно свака од изучаваних својстава протеина, као што су растворљивост, капацитет везивања уља и воде, желирање, филмогена својства, формирање и стабилност пена и емулзија. Додатно, размотрени су и детаљно описани фактори који утичу на поменута својства. У трећем делу описане су методе модификације протеина у циљу промене и унапређења функционалних карактеристика. У оквиру ове целине посебно су размотрене хемијске и ензимске модификације протеина. Дат је преглед најзначајнијих хемијских модификација на бочним остацима аминокиселина у протеинима, као и метода умрежавања</p>

протеина. Додатно, направљен је и студиозан пресек литературе о примени хемијских метода за унапређење функционалних карактеристика протеина. Наставак овог дела односи се на ензимске методе модификације протеина, које су изучаване кроз два аспекта: ензимска хидролиза и ензимско умрежавање. Размотрени су фундаментални аспекти ензимске хидролизе биљних глобулина, са детаљним објашњењем значајних фактора процеса, укључујући: протеазе, карактеристике протеинских супстрата, физичко-хемијске параметре реакције и степен разградње супстрата, односно степен хидролизе (енгл. Degree of hydrolysis, DH). У овом делу је посебно назначен утицај наведених фактора на функционалне особине хидролизата. Такође, фундаментални аспекти ензимског процес умрежавања протеина применом ензима трансглутаминазе детаљно су описани. Они су обухватили испитивања самог процеса умрежавања, опис метода за праћење тока реакција трансглутаминазе као и контролу ензимске реакције. У наставку је дат литературни преглед функционалних особина умрежених протеина као и њихове примене у индустрији. На крају дат је осврт на примену Методологије одзивних површина (енгл. Response Surface Methodology, RSM) на развој и оптимизацију ензимских процеса и изучавање променљивости функционалних својстава протеинских модификата у процесу.

У поглављу **Материјал и методе** дат је детаљан опис метода примењених у експерименталном раду. На почетку су описани поступци екстракције протеина и припреме кукурбитина из семена и погаче уљане тикве голице (*Cucurbita pepo* L. s.v. Olinka). Даље, описан је процес ензимске хидролизе, као и поступак ензимског умрежавања применом трансглутаминазе. За утврђивање параметара (DH), степена полимеризације (енгл. Degree of polymerisation, DP), и изучавање функционалних особина протеинских модификата примењене су најсавременије аналитичке методе, верификоване у литератури ове научне области. За статистичку обраду експерименталних података коришћени су савремени софтверски програми, а резултати обрађени на адекватан и валидан начин.

У поглављу **Резултати и дискусија** редослед приказаних резултата прати ток истраживања и према задатку рада подељено је на два дела. У оквиру прелиминарних истраживања, изведена је компаративна студија изоловања и испитивања функционалних особина кукурбитина добијеног из семена и погаче уљане тикве. Први део Резултати и дискусије обухвата контролу и оптимизацију процеса ензимске хидролизе применом протеолитичких ензима. Испитан је процес хидролизе и хидролизати су окарактерисани SDS-гел електрофорезом. У наставку су приказани резултати примене RSM за контролу DH и оптимизацију процеса ензимске хидролизе. Резултати обухватају оптимизацију хидролизе кукурбитина из погаче уљане тикве са бромелаином. Након тога, приказани су резултати функционалних особина хидролизата кукурбитина добијених дејством алакалазе, пепсина,

бромелаина и флаворзима, и протумачена је зависност функционалности хидролизата од врсте ензима и ДН. Последњи део првог дела резултата односи се на испитивање променљивости неких функционалних особина услед промена рН и јонске јачине раствора. Други део Резултата и дискусије обухвата контролу и оптимизацију процеса ензимског умрежавања применом ензима трансглутаминазе. Оптимизација процеса и контрола продукције модификата кукурбитина дефинисаних вредности DP изведена је применом RSM. Након тога приказани су резултати функционалних особина умреженог кукурбитина и протумачена њихова зависност од величине DP.

У поглављу **ЗАЉУЧАК**, закључци су јасно и концизно изведени из резултата и њихове дискусије, те се могу сматрати поузданим и одговарајућим постављеном циљу дисертације.

У последњем поглављу, **ЛИТЕРАТУРА**, наводи се 328 референци које су коришћене у писању ове дисертације. Литература је цитирана на умешан и правилан начин, а избор референци је актуелан (више од трећине цитата су новијег датума) и примерен тематици која је проучавана.

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

Истраживања која су урађена у оквиру докторске дисертације, верификована су у следећим часописима и саопштењима на скуповима међународног и националног значаја:

##### **M<sub>21</sub> - Радови у врхунским међународним часописима**

1. Peričin, D., Radulović, Lj., Trivić, S. and Dimić, E. (2008) Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method, *Journal of Food Engineering*, 84 (591-594).
2. Popović, Lj., Peričin, D., Vaštag, Ž. i Popović, S. (2011) Optimization of transglutaminase cross-linking of pumpkin oil cake globulin; Improvement of the solubility and gelation properties, *Food and Bioprocess Technology*, DOI: 10.1007/s11947-011-0673-9

##### **M<sub>23</sub> – Рад у међународном часопису**

1. Popović, Lj., Peričin, D., Vaštag, Ž. i Popović, S. (2011) Optimization of enzymatic hydrolysis of cucurbitin using response surface methodology: Improvement of the Functional Properties, *International Journal of Food Engineering* 7 (5) Article 18

**M<sub>34</sub> - Саопштења са међународног скупа штампано у изводу**

1. Popović, Lj., Peričin, D., Vaštag, Ž. Popović, S. Optimization of enzymatic cross-linking of protein from pumpkin oil cake using RSM; Improvement of the functional properties. Biotech 2011 & 5th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, 15-17 June, 2011, Prague, Czech Republic.
2. **Popovic, Lj.** Hydrolysis of pumpkin oil cake globulin-cucurbitin by pepsin; Antioxidant and functional properties of resulting hydrolysates, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 14-18 September, 2010, Rimini, Italy.
3. Peričin, D. **Popović, Lj.**, Vaštag, Z. and Popović, S. Enzymatic hydrolysis and cross-linking of pumpkin seed proteins, "ISIRR 2010", Szeged, Hungary, 13-15 October, 2010.
4. **Popović, Lj.**, Peričin, D. Vaštag, Z. and Popović, S. Improving of the functional properties of cucurbitin, pumpkin seed globuline, by enzymatic modification "ISIRR 2010", Szeged, Hungary, 13-15 October, 2010.
5. **Popović, Lj.**, Vaštag, Ž., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. Some functionally properties of pumpkin oil cake globulin-cucurbitin modified by bromelain, New Challenges in Food Preservation, 11-13 November, 2009, Budapest, Hungary.

**M<sub>63</sub> - Саопштења са скупа националног значаја штампано у целини**

1. Peričin, D. **Radulović, Lj.** (2007); Response surface methodology: Solubility of protein isolate from pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*), 45. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 2007.
2. Peričin, D. **Radulović, Lj.** (2007); Enzymatic process for extraction of water soluble proteins from pumpkin seed (*Cucurbita pepo*), 45. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 2007.
3. Peričin D. i **Radulović, Lj.** (2006) Proteini i njihova ekstrakcija iz semena i pogače uljane tikve golice c.c «Olinka», 47. savetovanje Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova (169- 174), Herceg Novi, 2006.
4. Peričin, D., Dimić E., **Radulović, LJ.**, Romanić, R. (2005) Kombinovani efekti različitih enzimskih aktivnosti u predtretmanu semena uljane tikve, 46. savetovanje Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova (101-106), Petrovac na moru, 2005.

**M<sub>64</sub> - Саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу**

1. Peričin, D., **Popović, Lj.**, Vaštag, Ž., Popović, S. Optimizacija rastvorljivosti proteina pogače uljane tikve enzimskim umrežavanjem sa transglutaminazom. XLIX Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, 13-14. maj 2011 Kragujevac.
2. **Popović, Lj.**, Peričin, D., Popović, S., Vaštag, Ž., Unapređenje funkcionalnih osobina

globulina pogače uljane tikve; Enzimске модификације XLIX Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, 13-14. мај 2011 Kragujevac.

## VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Истраживања у оквиру дисертације фокусирана су на развој ензимских процеса модификације глобулина уљане тикве голице (*Cucurbita pepo*), кукурбитина, са два аспекта:

- (I) ензимска хидролиза применом протеолитичких ензима и
- (II) ензимско умрежавање применом ензима типа трансфераза (трансглутаминазе).

Контрола и оптимизација оба ензимска процеса је изведена у циљу добијања протеинских модификата циљаних функционалних карактеристика.

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

1. Екстракција протеина из семена уљане тикве (*Cucurbita pepo*) изведена је процесом исољавања и воденом екстракцијом уз примену комплекса ензима за разградњу ћелијског зида (енгл. "Cell-Wall Degrading Enzymes" CWDE), као и њиховом комбинацијом. Протеински састав семена одређен је SDS гел електрофорезом. Добијени резултати показују да је глобулинска фракција доминантна протеинска компонента семена уљане тикве. Такође, резултати јасно упућују на то да метода исољавања, са економског аспекта, представља погоднију технику за екстракцију глобулинске компоненте-кукурбитина, у односу на ензимски екстракциони процес.
2. У оквиру прелиминарних, компаративних испитивања функционалних особина кукурбитина, добијеног из (i) семена и (ii) погаче уљане тикве (*Cucurbita pepo*) утврђено је да испитиване особине кукурбитина из оба извора нису статистички различите ( $p < 0.05$ ). Стога, уљана погача може успешно да се користи као извор за изоловање кукурбитина.
3. Растворљивост, представља једну од најзначајнијих карактеристика протеина због свог утицаја на све остале функционалне особине. Испитан је утицај концентрације NaCl и промена рН вредности и температуре на растворљивост кукурбитина. Рачунарским моделовањем уз примену RSM може се дефинисати математичка једначина за оптимизацију услова за постизање максималне растворљивости кукурбитина. Највећа растворљивост кукурбитина (9 mg/ml) може се добити на температури од 54 °C, рН вредности 7.69 и концентрацији NaCl 4%.
4. Процеса ензимске хидролизе кукурбитина оптимизиран је применом RSM у циљу добијања хидролизата тачно дефинисаних вредности ДН. Математички је дефинисана зависност између ДН, као излазне величине и E/S односа и времена, као параметара у процесу хидролизе кукурбитина применом бромелаина. E/S однос од 0.0132 g/g и време

од 42 минута дефинисани су као оптимални услови за постизање максималне вредности DH (36%) у процесу хидролизе кукурбитина бромелаином.

5. Компаративна испитивања функционалних особина хидролизата кукурбитина различитих вредности DH добијених дејством алкалазе, флаворзима, бромелаина и пепсина су изведена. Сви добијени хидролизати показују унапређење испитиваних функционалних особина у односу на нехидролизоване протеин-кукурбитин. Растворљивост хидролизата највише је повећана у опсегу рН вредности од 6.0-8.0, дејством свих ензима у односу на кукурбитин. Највише вредности за EAI и ESI (0.77  $A_{500nm}$  и 87.5мин, респективно) постигнуте су код хидролизата вредности DH 9.2 % добијеног применом флаворзима. Максималну вредност за FC (242±3.21 %) има хидролизат добијен применом алкалазе DH вредности од 30%.
6. У циљу унапређења функционалних особина кукурбитина, као и проширења могућности примене, извршена је модификација протеинске структуре умрежавањем дејством ензима трансглутаминазе. Применом RSM оптимизиран је процес умрежавања. Математички је дефинисана зависност између DP, као излазне величине и E/S односа, температуре и времена, као параметара у процесу умрежавања кукурбитина. E/S однос 1/4.9, температуре од 28°C и време од 39 минута дефинисани су као оптимални услови за постизање максималне вредности DP (70%) у процесу умрежавања кукурбитина дејством трансглутаминазе.
7. Умрежавањем кукурбитина, дејством трансглутаминазе, настали су модификовани протеини побољшаних вредности растворљивости и способности желирања у односу на нативни кукурбитин. Растворљивости кукурбитина дејством трансглутаминазе повећана је и до пет пута у опсегу рН вредности од 5.0 до 8.0 где кукурбитин и има најмању растворљивост (око 0.5 mg/ml). Такође, доказана је корелација растворљивости модификата и вредности DP. Порастом вредности DP кукурбитина расте и растворљивост при свим испитиваним рН вредностима. Најбоље особине желирања умреженог кукурбитина се постижу на рН 5.0 где вредност за LGC износи 4%. Са друге стране, највеће смањење вредности LGC кукурбитина дејством трансглутаминазе се постиже на рН 9.0, где се LGC вредност смањује са 16% на 8%. Примена ензима за продукцију високо функционалних протеина из уљаних погача може бити практична технологија која омогућује превођење нуспроизвода у нове изворе ингредијената хране.

**VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

Кандидаткиња Љиљана Поповић, дипл. инж., је у целости обавила истраживања која су била предвиђена планом у пријави ове дисертације. Добијени резултати су проистекли из оригинално постављених лабораторијских испитивања ензимских процеса у циљу добијања протеинских модификата унапређених функционалних особина. Резултати истраживања су систематично и прегледно приказани, а дискусија заснована на добром познавању истраживане научне области и на најновијим научним сазнањима, те се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

**IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

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

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе  
Дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација представља оригинални допринос науци јер су постављене научне основе за примену различитих биопроцеса за модификовање биљних глобулина ради унапређења њихових функционалних карактеристика. Научни допринос резултата истраживања верификован је објављивањем 3 рада у међународним часописима на SCI листи. Прегледом најновије литературе је установљено да је ензимска модификација протеина у циљу побољшања функционалних особина атрактивна област научних истраживања. У прехранбеној индустрији константно постоји потражња за новим производима који морају да задовоље све више критеријуме и потребе потрошача. Са друге стране, значајне количине, високо вредних материјала заостају као нуспродукти прехранбене индустрије и представљају проблем и са еколошког и економског аспекта. Примена и развој биопроцеса, првенствено због својих ниских инвестиционих трошкова, нуди решење за ове проблеме прехранбене индустрије. Стога, примена ензимских процеса за модификацију протеина, представља веома атрактиван начин за добијање продуката, са новим, побољшаним функционалним својствима. Такође, ензимски процеси као што је хидролиза и умрежавање могу бити алтернативни приступи за валоризацију протеински богатих нуспродуката. У том циљу, истраживања заснована на примени и развоју биопроцеса за искоришћавање и валоризацију нуспродуката индустрије уља, као извора протеина, од великог су значаја. Уједно, ензимска модификација доминантне протеинске фракције из ових извора (11-12S глобулина) повећава могућност њихове примене као високо вредних функционалних и биолошких компоненти хране. Потврда да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада се огледа и у радовима објављеним у водећим међународним часописима.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања  
Недостаци дисертације нису уочени.



<b>X ПРЕДЛОГ:</b>
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
- Полазећи од позитивне оцене докторске дисертације Љињане Поповић, дипл. инж, Комисија задовољством предлаже да се прихвати ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ, а кандидаткињи одобри одбрана рада.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

—  
Пр

—

—