

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/321

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

27. 12. 2024.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације
и о одређивању ментора

Молимо да, сходно чл. 48 ст. 5 тач. 3) Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“ бр. 201/2018, 207/2019, 213/2020, 214/2020, 217/2020, 230/21, 232/22, 233/22 и 236/22), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Изолација и ензимска модификација мембранских протеина из отпадне лисне биомасе за примену у наноемулзијама и инкапсулацији биоактивних једињења

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Технолошко инжењерство

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

Марија (Милан) Корићанац

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Мастер инжењер технологије, Биохемијско инжењерство и биотехнологија

3. Година завршетка претходног нивоа студија: 2021.

4. Година уписа на докторске студије: 2021.

5. Назив студијског програма докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

6. Датум подношења пријаве теме докторске дисертације:

31.10. 2024.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

за кандидата **Марију Корићанац**

Име и презиме ментора: др Зорица Кнежевић-Југовић

Звање: Редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Knežević-Jugović, Z.**, Culetu, A., Mijalković, J., Duta, D., Stefanović, A., Šekuljica, N., Đorđević, V., Antov, M., Impact of Different Enzymatic Processes on Antioxidant, Nutritional and Functional Properties of Soy Protein Hydrolysates Incorporated into Novel Cookies (2023) **Foods**, 12 (1), art. no. 24, ISSN: 2304-8158; IF(2021) 5,561. Food Science & Technology 35/144; DOI: 10.3390/foods12010024.
2. Perović, M.N., **Knežević Jugović, Z.D.**, Antov, M.G. Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction (2020) **Journal of Food Engineering**, 276, art. no. 109894. ISSN: 0260-8774; IF(2020) 5,354. Engineering, Chemical 28/143; Food Science & Technology 23/144; DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109894.
3. Pavlović, N., Mijalković, J., Đorđević, V., Pecarski, D., Bugarski, B., **Knežević-Jugović, Z.** Ultrasonication for production of nanoliposomes with encapsulated soy protein concentrate hydrolysate: Process optimization, vesicle characteristics and in vitro digestion (2022) **Food Chemistry: X**, 15, art. no. 100370. ISSN: 2590-1575, IF(2022) 6,1; Chemistry, Applied 10/73; Food Science & Technology 13/141; doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100370.
4. Stefanović, A.B., Jovanović (Mijalković), J.R., Dojčinović, M.B., Lević, S.M., Nedović, V.A., Bugarski, B.M., **Knežević-Jugović, Z.D.** Effect of the Controlled High-Intensity Ultrasound on Improving Functionality and Structural Changes of Egg White Proteins (2017) **Food and Bioprocess Technology**, 10 (7), pp. 1224-1239. ISSN: 1935-5130; IF(2017) 2,998; Food Science & Technology 30/133; DOI: 10.1007/s11947-017-1884-5.
5. Đurović, S., Nikolić, B., Pisinov, B., Mijin, D., **Knežević-Jugović, Z.**, Microwave Irradiation as a Powerful Tool for Isolating Isoflavones from Soybean Flour (2024) **Molecules**, 29 (19), art. no. 4685, ISSN: 1420-3049; IF(2023) 4,2; Biochemistry & Molecular Biology 85/285; DOI: 10.3390/molecules29194685.

ДЕКАНКА ФАКУЛТЕТА

Проф. др Мирјана Кијевчанин

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће

(назив надлежног тела факултета)

на седници одржаној 26.12.2024. године размотрило предложену тему и закључило да је

тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

ДП

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл. 33. Правилника о докторским студијама ТМФ-а на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 26.12.2024. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **Марије Корићанац**, број индекса 4001/21, под називом: **„Изолација и ензимска модификација мембранских протеина из отпадне лисне биомасе за примену у наноемулзијама и инкапсулацији активних једињења“.**

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За ментора се одређује др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Одлуку доставити: Универзитету у Београду, кандидату, ментору, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н К А

Проф. др Мирјана Кијевчанин

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Марије Корићанац, мастер инжењера технологије, за израду докторске дисертације

Одлуком 35/277 бр. од 7.11.2024 године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Марије Корићанац за израду докторске дисертације и научне заснованости теме *Изолација и ензимска модификација мембранских протеина из отпадне лисне биомасе за примену у наноемулзијама и инкапсулацији биоактивних једињења*.

На основу прегледа и анализе материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1 Биографски подаци

Марија М. Корићанац, мастер инж. технологије - мастер инжењер биотехнологије, рођена је 17.08.1997. године у Београду. Основну школу похађала је у Београду, где је затим школовање наставила у Дванаестој београдској гимназији. Уписала се на Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду школске 2016/2017. године и дипломирала у септембру 2020. године одбраном завршног рада на тему *Селекција микроорганизама за производњу ксиланаза* на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија са просечном оценом током студија 8,98 и оценом на завршном раду 10 (десет). Марија Корићанац се током студирања на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета у Београду истицала изузетним радним навикама. Мастер студије на истом студијском програму уписала је 2020/2021. године и дипломирала у септембру 2021. године одбранивши мастер рад на тему *Изолација, пречишћавање и делимична карактеризација ксиланазе из *Penicillium chrysogenum** са просечном оценом током студија 9,38 и оценом 10 на мастер раду. По завршетку мастер студија, уписала је докторске студије на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија под менторством проф. др Зорице Кнежевић-Југовић. Од марта 2022. године запослена је на Технолошком металуршком факултету као истраживач приправник, преко конкурса Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије, под називом: „Конкурс за талентоване младе истраживаче-студенте докторских академских студија за укључивање у научноистраживачки рад у акредитованим научноистраживачким

организацијама”. Марија Корићанац активно ради са студентима основних и мастер студија при изради завршних и мастер радова.

1.2. Сечено научноистраживачко искуство

Марија М. Корићанац је уписала докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду школске 2021/2022. године на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 10 (десет/100) и одбранила завршни испит такође са оценом 10.

Преглед положених испита на докторским академским студијама са оценама и ЕСПБ бодовима:

Редни број	Назив предмета	Оцена	ЕСПБ
1	Одабрана поглавља нумеричке анализе	10	5
2	Хемијска кинетика	10	5
3	Одабрана поглавља биохемије-витамини	10	5
4	Биохемијска кинетика	10	5
5	Структурна анализа органских молекула	10	6
6	Биомаса као извор енергије	10	4
7	Биоактивне материје у козматичким производима	10	4
8	Индустријска микробиологија	10	5
9	Бионеорганска хемија	10	5
10	Принципи органске синтезе	10	6
11	Енглески језик	10	/
12	Завршни испит	10	30
Просечна оцена/Збир бодова		10	80

Изабрана је у звање истраживач приправник 10. марта 2022. године, а од априла 2022. године запослена је у том звању на Технолошко-металуршком факултету у Београду.

У досадашњем научноистраживачком раду објавила је као коаутор један рад у истакнутом међународном часопису (M21), као и два саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34). Током свог ангажовања учествовала је у извођењу и изради неколико завршних и мастер радова студената.

Списак објављених научних и стручних радова

1. Радови објављени у научним часописима међународног (M20)

1.1. Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. Mijalković, Jelena, Šekuljica, Nataša, Jakovetić Tanasković Sonja, Petrović Predrag, Balanč Bojana, **Korićanac Marija**, Conić Ana, Bakrač Jelena, Đorđević Verica, Bugarski Branko, Knežević-Jugović Zorica (2024). Ultrasound as Green Technology for the Valorization of Pumpkin Leaves: Intensification of Protein Recovery. *Molecules*, 29(17), 4027-4027. ISSN: 1420-3049. IF: 4,2 (2023), *Biochemistry and Molecular Biology*, 85/285.

2. Зборници међународних научних скупова (M30)

2.1. Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

1. Knežević-Jugović Zorica, Jovanović Jelena, Simović Ružica, **Korićanac Marija**, Jugović Branimir, Antov Mirjana (2024). Production of Bioactive Peptides from RuBisCO Protein Fractions of Pumpkin Leaves through *In Vitro* Enzymatic Hydrolysis and *In Silico* Method. In: PROCEEDINGS / 50th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering SSCHE 2024, Book of Abstracts, page 1, ISBN: 978-80-8208-118-6, (May 20 - 24).

2. Šekuljica Nataša, Mijalković Jelena, Jakovetić-Tanasković Sonja, **Korićanac Marija**, Gazikalović Ivana, Knežević-Jugović Zorica (2023). Testing The Quality of White and Green Leaf Proteins Using Mixolab for Applications in Bakery Products Formulations. In: Book of abstracts / 26th Congress of SCTM with international participation Metropol Lake Resort Ohrid, R. Macedonia, Book of Abstracts, page 148, ISBN: 978-9989-760-19-8, (September 20–23).

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија, Марија Корићанац је показала склоност и изразиту способност за бављење научноистраживачким радом. Истраживање на предложеној теми докторске дисертације укључује развој и оптимизацију метода изоловања и ензимске модификације протеина из отпадне биљне биомасе, а кандидаткиња је стекла значајно искуство и вештине из области производње и примене ксиланаза, веома важних ензима за разградњу лигноцелулозне фракције. У области истраживања била је коаутор једног рада у врхунском међународном часопису (M21) на тему ултразвучне екстракције протеина из зелене биомасе и два саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34). На основу наведеног, Комисија закључује да кандидаткиња Марија Корићанац испуњава услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је изолација мембранских протеина из биљног отпадног материјала и њихова модификација ради унапређења функционалних својстава и примене као емулгатора у наноемулзијама и инкапсулацији биоактивних једињења.

Са све већим нагласком на одрживости и проналажењу алтернативних извора протеина који би заменили традиционалне уз очување биодиверзитета и заштиту животне средине, све већа пажња се усмерава на зелену биомасу као један од најраспрострањенијих извора протеина у отпадним агроиндустријским токовима. У савременим истраживањима, алтернативним протеинима се све више придаје значај због континуираног раста људске популације и све веће забринутости о одрживој производњи меса и протеинских усева попут соје. Неке од актуелних области примене алтернативних протеина у савременој биотехнологији укључују производњу функционалне хране, израду наноматеријала, инкапсулацију биоактивних једињења и добијање биоактивних пептида.

Лисна биомаса има велики потенцијал као сировина због високог садржаја протеина, који износи 10-20% суве материје. Око 80% лисних протеина је концентрисано у хлоропластима, чија је примарна улога обављање фотосинтезе. Важно је напоменути да је аминокиселински састав ових протеина релативно константан међу различитим биљним врстама, што доприноси њиховој применљивости. Са друге стране, треба узети у обзир да састав лисне биомасе, као и код сваког биолошког материјала, варира у зависности од спољашњих услова средине, од којих су неки важнији утицаји већ описани у литератури.

Различити поступци су испитивани за изолацију лисних протеина, са посебним нагласком на изолацију ензима рибулоза-бисфосфатне карбоксилазе/оксигеназе, који припада растворљивој фракцији протеина. Основни принцип изоловања заснива се на разликама у растворљивости две основне протеинске фракције у води, које су приближно једнако заступљене у лисној биомаси, при чему су *тзв.* „бели протеини” растворљиви у води, док су „зелени протеини” нерастворљиви и везани за тилакоидну мембрану. Поред тога, фракција белих протеина је углавном хомогена, док се зелени протеини разликују по садржају хидрофобних аминокиселина, сулфхидрилних група и количини наелектрисања, што усложњава поступке издвајања. У истраживањима углавном се разматра добијање беле протеинске фракције, док зелени протеини због своје термолабилности и нерастворљивости заостају у споредним токовима.

Мембрански, „зелени протеини”, који су концентрисани и везани за тилакоидну мембрану, чине важан део потенцијала лисне биомасе као извора протеина. Организовани су у комплексе који обухватају интегралне и периферне протеине. Интегрални мембрански протеини чине око 350 различитих врста, док периферни протеини, који су везани за мембрану преко нековалентних интеракција или поларних делова липидног двослоја, чине око 170 протеина са стромалне и 130 са луменалне стране. Интегрални протеини имају хидрофобне и хидрофилне домene који омогућавају њихово уклапање у липидну мембрану. Ови протеини често формирају комплексе са пигментима, попут хлорофила и каротеноида, који су одговорни за фотосинтетске процесе. Комплекси попут фотосистемских протеина (PSI и PSII), цитохромског *b6f* комплекса и АТФ синтазе представљају основне протеине тилакоидне мембране. Док је растворљива фракција протеина темељно проучавана са аспекта техно-функционалних својстава и различитих примена у разним индустријама, зелени мембрански протеини су и даље недовољно испитани, посебно у погледу њихове модификације и могућих примена. Изузетан технолошки изазов представља пречишћавање и унапређење функционалних својстава мембранских протеина за примену у исхрани људи, јер је досадашња примена лимитирана на исхрану животиња.

Научни и практични интерес за искоришћењем зелене фракције протеина почео је постепено да расте, тако да се може наћи неколико новијих радова у литератури. Потврђен је позитивни учинак ових протеина на инхибицију ензима липазе панкреаса, што посредно доводи до осећаја ситости и тиме до редукције телесне масе. На овај начин, ови протеини имају потенцијалну примену у развоју различитих дијететских суплемената за обављање одређених функција у телу, нарочито код особа које пате од метаболичког синдрома. Такође, започета су истраживања зелених протеина као протеинских емулгатора, при чему је показано да има потенцијала за њихову даљу модификацију и примену.

Циљ истраживања ове докторске дисертације је изолација и модификација мембранских протеина из биљног отпадног материјала, применом различитих биотехнолошких и других

поступака, са посебним освртом на њихова функционална својстава и могућу примену као емулгатора у наноемулзијама и за инкапсулацију биоактивних једињења. Биотехнолошким и физичко-хемијским модификацијама протеина може доћи до унапређења њихових функционалних својстава, што даље отвара бројне могућности за њихову примену. Неке технике које се често примењују у случају других протеина и које су од важности за овај рад су примена микро- и ултразвучних таласа, метода промене рН вредности (тзв. *pH shift третман*) и ензимска модификација применом различитих ензима. Заједничка карактеристика свих ових метода јесте да се њихово дејство заснива на структурним променама протеина.

Биљни материјал који је од интереса за овај рад јесте отпадна лисна биомаса. Испитаће се потенцијал отпадног лишћа, нуспроизвода агроиндустријске производње, као могућег извора протеина. Главни фокус биће на лишћу бундеве, грашка и амаранта. Поред очигледних предности у погледу расположивости у споредним токовима прераде бундеве, грашка и житарица, ове сировине одликује и висок садржај протеина. Први корак јесте одређивање хемијског састава лишћа, нарочито у погледу састава лигноцелулозне фракције, како би се формулисали специфични ензимски препарати за циљану и контролисану хидролизу мембрана биљних ћелија и хлоропласта и омогућила олакшана екстракција протеина.

Изолација лисних протеина у предложеној дисертацији засниваће се на интегралном поступку, који омогућава искоришћење беле и зелене фракције протеина, уз смањење губитака у споредним токовима. При томе, отвара се могућност увођења нових корака у технолошку шему пречишћавања протеина, као и примене комбинација различитих метода. Основни принцип је максимално искоришћење целокупних протеина лисне биомасе, односно добијање две функционалне протеинске фракције. При сваком кораку пречишћавања пратиће се садржај суве материје и дистрибуција протеина у сувој материји, на основу којих ће бити одређени материјални биланси и приноси. С обзиром да су својства зелених протеина литературно недовољно окарактерисана, добијени зелени протеински прах биће детаљно пречишћаван и окарактерисан, како са аспекта физичко-хемијских и нутритивних својстава, тако и функционалних својстава са аспекта примене у наноемулзијама и инкапсулацији биоактивних једињења.

Пречишћавање зелених протеина представља значајан изазов због њихове мале растворљивости и хетерогености у погледу наелектрисања и степена хидрофобности. Претходна истраживања углавном су се ослањала на методе изолације мембранских протеина применом органских растварача и детрџената, што се показало као неповољно због њиховог штетног утицаја на животну средину и незадовољавајућег квалитета изолованих протеина. Ова теза се заснива на развоју техника екстракције нерастворних зелених протеина које могу значајно побољшати њихову растворљивост. Основни принцип ових техника огледа се у структурној модификацији протеина, због чега је од круцијалне важности испитати и пронаћи везу између структуре и функционалних својстава одабраних протеина зелене фракције. Испитаће се различити приступи, од мање до више агресивних метода, са различитим механизмом дејства, чији ће се потом учинак међусобно поредити. Методе које ће се анализирати укључују физичке, хемијске и ензимске третмане, као и њихове комбинације. Посебан фокус ће бити на детаљној анализи утицаја сваке методе на структуру протеина, како би се пронашла оптимална техника за модификацију зелених протеина са аспекта примене у наноемулзијама и инкапсулацији биоактивних једињења.

Протеини, као површински активни молекули, имају велики потенцијал за формирање емулзија, чија примена има све већи значај, јер истовремено нутритивно обогаћују производе. Надаље, због велике стабилности ових система могу се користити за формирање наноемулзија, које имају широку примену, на пример, у контролисаном отпуштању активних супстанци, структурирању хране, формулацији козметичких препарата, синтези биоматеријала и другим областима. Инкорпорација зелених протеина у двофазни систем, уље/вода, захтева оптимизацију различитих процесних параметара, што ће бити детаљно испитано.

Појединачни циљеви у оквиру ове дисертације су:

- хемијска карактеризација отпадног биљног материјала (лисна биомаса бундеве, грашка, амаранта), са посебним освртом на састав лигноцелулозне фракције, како би се формулисали специфични ензимски препарати за циљану и контролисану хидролизу мембрана биљних ћелија и хлоропласта, унапређујући кинетику екстракције протеина;
- дефинисање интегралне технолошке шеме изоловања протеина из лисне биомасе у погледу добијања две функционалне протеинске фракције;
- пречишћавање зелене протеинске фракције до функционалног облика;
- карактеризација зеленог протеинског праха у погледу хемијског састава, нутритивне вредности, сензорних својстава, дигестивности и функционалних својстава;
- модификација изолованих зелених протеина применом три различите технике и њихових комбинација, оптимизација методе кроз анализу растворљивости и емулгационих својстава протеина;
- анализа структурних промена модификованих протеина и успостављање корелације између структуре и растворљивости, као и структуре и емулгационих својстава протеина;
- оптимизација поступка формирања стабилних емулгујућих система и њихова примена за инкапсулацију биоактивних једињења.

Релевантни библиографски извори, повезани са предметом истраживања ове докторске дисертације, који уједно представљају полазну основу за даљи ток истраживања су:

[1] Steven R Hertzler, Jacqueline C Lieblein-Boff, Mary Weiler and Courtney Allgeier (2020). Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function, *Nutrients*, 12(12):3704.

[2] Kai Kai Ma, Maija Greis, Jiakai Lu, Alissa A Nolden, David Julian McClements and Amanda J Kinchla (2022). Functional Performance of Plant Proteins, 18;11(4):594.

[3] Melvin Tan, Malik Adil Nawaz and Roman Buckow (2021). Functional and food application of plant proteins – a review, *Food Reviews International*, 39(5) 2428-2456.

[4] Roberto Fiorentini and Carlo Galoppini (1983). The proteins from leaves, *Plant Foods for Human Nutrition* 32:335–350.

- [5] Milad Hadidi, Fatemeh Aghababaei, Diego J. Gonzalez Serrano, Gulden Goksen, Monica Trif, David Julian McClements and Andres Moreno (2024). Plant-based proteins from agro-industrial waste and by-products: Towards a more circular economy, *International Journal of Biological Macromolecules*, 261:129576.
- [6] Estefanía Álvarez-Castillo, Manuel Felix, Carlos Bengoechea and Antonio Guerrero (2021). Proteins from Agri-Food Industrial Biowastes or Co-Products and Their Applications as Green Materials, *Foods*, 10(5):981.
- [7] Jiayue Tang, Dan Yao, Shuaibo Xia, Lingzhi Cheong and Maolin Tu (2024). Recent progress in plant-based proteins: From extraction and modification methods to applications in the food industry, *Food Chemistry X*, 23:101540.
- [8] Zakir Showkat Khan, Saira Amir, Tea Sokač Cvetnić, Ana Jurinjak Tušek, Maja Benković, Tamara Jurina, Davor Valinger and Jasenka Gajdoš Kljusurić (2023). Sustainable Isolation of Bioactive Compounds and Proteins from Plant-Based Food (and Byproducts), 12(16):2904.
- [9] Alexander V Ruban and Matthew P Johnson (2015). Visualizing the dynamic structure of the plant photosynthetic membrane, *Nat Plants*, 3(1):15161.
- [10] L. Andrew Staehelin and Georg W. M. van der Staay (1996). Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Structure, Composition, Functional Organization and Dynamic Properties of Thylakoid Membranes (pp. 11-30). Springer Book Archive.
- [11] Anna-Lovisa Nynäs, William R Newson and Eva Johansson (2021). Protein Fractionation of Green Leaves as an Underutilized Food Source Protein Yield and the Effect of Process Parameters, *Foods*, 10(11):2533.
- [12] Angelica Tamayo Tenorio, Jarno Gieteling, Govardus de Jong, Remko M. Boom and Atze J. van der Goot (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilization, *Food Chemistry* 203:402-408.
- [13] Shixiang Liu, Zhihua Li, Bing Yu, Song Wang, Youqing Shen, Hailin Cong (2020). Recent advances on protein separation and purification methods, *Advances in Colloid and Interface Science*, 284:102254.
- [14] Sara Pérez-Vila, Mark A. Fenelon, James A. O'Mahony and Laura G. Gómez-Mascaraque (2022). Extraction of plant protein from green leaves: Biomass composition and processing considerations, *Food Hydrocolloids*, 133:107902
- [15] Tristan Muller, Marie-Ève Bernier and Laurent Bazinet (2023). Optimization of Water Lentil (Duckweed) Leaf Protein Purification: Identification, Structure, and Foaming Properties, *Foods*, 12(18):3424
- [16] O. Aletor, A.A. Oshodi and K. Ipinmoroti (2002). Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates, *Food Chemistry* 78:63–68.

- [17] B.P.Lamsal, R.G.Koegel and M.E.Boettcher (2003). Separation of protein fractions in alfalfa juice: Effects of some pre-treatment methods, *American Society of Agricultural Engineers*, 46: 715–720.
- [18] M.Vergara-Barberán, M.J. Lerma-García, J.M. Herrero-Martínez and E.F. Simó- Alfonso (2014). Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves, *Food Chemistry*, 169: 28-33.
- [19] Maaïke Nieuwland, Peter Geerdink, Nicole P. E. Engelen-Smit, Ingrid M. van der Meer, Antoine H. P. America, Jurriaan J. Mes, A. Maarten J. Kootstra, Jolanda T. M. M. Henket and Wim J. Mulder (2021). Isolation and Gelling Properties of Duckweed Protein Concentrate, *ACS Food Science & Technology*, 1(5): 908–916.
- [20] A. Tamayo Tenorio, E. W. M. de Jong, C. V. Nikiforidis, R. M. Boom and A. J. van der Goot (2017). Interfacial properties and emulsification performance of thylakoid membrane fragments, *Royal Society of Chemistry*, 13:608-618.
- [21] Marilyn Rayner, Sinan Cem Emek, Karolina Gustafssona, Charlotte Erlanson-Albertsson and Per-Åke Albertsson (2011). A novel emulsifier from spinach with appetite regulation abilities, *Procedia Food Science*, 1:1431-1438.
- [22] Jiang Jiang, Qingling Wang and Youling L Xiong (2018). A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins, *Current Opinion in Food Science*, 19:50-56.
- [23] Qingling WangYan, Jin and Youling L. Xiong (2018). Heating-Aided pH Shifting Modifies Hemp Seed Protein Structure, Cross-Linking, and Emulsifying Properties. *Structural and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolate*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (41):10663-10930.
- [24] Xixiang Shuai, Lizhi Gao, Qin Geng, Ti Li, Xuemei He, Jun Chen, Chengmei Liu and Taotao Dai (2022). Effects of Moderate Enzymatic Hydrolysis on Structure and Functional Properties of Pea Protein, *Foods*, 11(15):2368.
- [25] Jing Su and Artur Cavaco-Paulo (2021). Effect of ultrasound on protein functionality, *Ultrasonics Sonochemistry*, 76:105653.
- [26] Harjinder Singh and Anwesha Sarkar (2011). Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions, *Adv Colloid Interface Sci*, 9;165(1):47-57.
- [27] Mi Zhang, Liuping Fan, Yuanfa Liu, Shengquan Huang and Jinwei Li (2022). Effect of proteins on emulsion stability: The role of proteins at the oil–water interface, *Food Chemistry*, 397:133726.
- [28] Raquel Reis Lima, Maria Eduarda Martins Vieira, Nathalia da Silva Campos, Ítalo Tuler Perrone, Rodrigo Stephani, Federico Casanova and Antônio Fernandes de Carvalho. Synergism (2024). Synergism Interactions of Plant-Based Proteins: Their Effect on Emulsifying Properties in Oil/Water-Type Model Emulsions, *Applied science*, 14(17):8086.

[29] Fu Liu and Chuan-He Tang (2014). Emulsifying Properties of Soy Protein Nanoparticles: Influence of the Protein Concentration and/or Emulsification Process, J Agric Food Chem, 26;62(12):2644-54.

[30] Perović M., Knežević-Jugović Z.D., Antov M.G. (2024) Heat-induced nanoparticles from pumpkin leaf protein for potential application as β -carotene carriers, Future Foods, 9, art. no. 100310, DOI: 10.1016/j.fufo.2024.100310

3. Полазне хипотезе

Испитивања у оквиру ове докторске дисертације надовезују се на актуелну проблематику искоришћења биљног отпадног материјала као биообновљивог извора, са нагласком на валоризацији зелене фракције протеина. Зелени протеини су сложене структуре, често се налазе у пигментно-протеинским комплексима који, заједно са глицеролипидима, изграђују тилакоидну мембрану. Структура ових протеина недовољно је проучена, као и њихова карактеризација, изолација, даља модификација и примена. Основни циљ је развој нових, иновативних приступа обраде зелених протеина и њиховој примени у стабилизацији емулзија и наноемулзија. Посебан акценат је стављен на њихову потенцијалну примену у храни, као и на контролисано отпуштање биоактивних једињења.

Полазне хипотезе у оквиру ове дисертације су:

- Прва хипотеза претпоставља да је могуће успешно изоловати и пречистити зелене протеине из споредних токова генерисаних током изолације белих протеина из отпадне лисне биомасе, чиме се повећава укупна искоришћеност лисних протеина и економичност процеса. С обзиром да се у научној литератури мали број радова бави изолацијом зелене протеинске фракције, полазна претпоставка је да ће се применом ензимске екстракције пулпе, која заостаје након пресовања лишћа, повећати искоришћење ових протеина. Оправданост овог приступа потврђује чињеница да се изолацијом само беле протеинске фракције искористи тек половина укупних лисних протеина. Због тога ће се у овом раду анализирати протеински прахови који настају као споредни токови током изолације белих протеина, уз претпоставку да је могуће пречистити зелене протеине до задовољавајућег нивоа и добити протеине одговарајуће нутритивне вредности и функционалности. Главни изазов представља лоша растворљивост зелених протеина, као и присуство осталих компонената у праху, што додатно компликује процес пречишћавања.
- Друга хипотеза овога рада је да је могуће унапредити нутритивна, сензорна и функционална својстава зелених протеина попут растворљивости, емулговања и стабилности кроз примену различитих физичко-хемијских и биолошких поступака. Третмани ће обухватити примену ултразвука и микроталаса, хемијске методе засноване на промени рН вредности (*тзв. pH-shift* метода) и Мајаровој реакцији, као и ензимску модификацију са протеазама и транслутаминазама. Претходна истраживања показала су изузетне резултате у модификацији различитих биљних протеина.
- Трећа хипотеза предвиђа да се анализом структурних промена протеина, (секундарне, терцијерне и кватернерне структуре), могу разумети механизми који доводе до унапређења функционалних својстава модификованих протеина. Ове промене укључују измене на амидним везама протеина, што посредно утиче на водоничне везе и друге интрамолекулске и интермолекулске интеракције. Као

результат тога, долази до варијација у садржају алфа-хеликса и бета-плоча код модификованих протеина у поређењу са нативним. Такође, анализом других типова веза у протеинима, попут сулфхидрилних група, могуће је прецизније утврдити природу насталих модификација.

- Коначно, четврта хипотеза заснована је на могућој примени модификованих зелених протеина као емулгатора. Претходна истраживања су указала на потребу за даљим унапређењем емулзија базираних на зеленом протеиним, те се претпоставља да би се модификацијом зелених протеина могли превазићи постојећи недостаци. Ова теза додатно претпоставља да ће модификовани зелени протеини имати потенцијал да делују као стабилизатори емулзија, са могућношћу примене у развоју наноемулзија. Очекује се да ће такве наноемулзије бити погодне за инкапсулацију биоактивних једињења у храни, доприносећи побољшању текстуре одабраних прехранбених емулзија и њиховом обогаћивању биоактивним супстанцама.

4. Научне методе истраживања

Први корак истраживања у оквиру ове докторске дисертације подразумева изолацију протеина из зелене биомасе применом метода познатих из литературе. За сада је развијена метода која обухвата механичко пресовање лишћа, термичку коагулацију, одвајање талога зелених протеина центрифуговањем и лиофилизацију талога. Иако је ова метода погодна за индустријску примену и фокусирана на искоришћење беле протеинске фракције, поступак термичког загревања може довести до денатурације зелених протеина, што отежава њихову даљу примену. У циљу превазилажења ових ограничења, испитаће се могућност одвајања зелених и белих протеина применом мембранских сепарација без загревања, као и смањење губитака протеина у пулпи ензимском екстракцијом. Хипотеза која ће се применити у раду је да ће се у току ензимске хидролизе компонената ћелијског зида или применом комбинације ензимске екстракције и физичког третмана, попут технологије ултразвука високог интензитета, ослободити велики удео протеина који заостаје у чврстој фракцији након примене конвенционалних технологија. У току ових поступака могуће је да ће доћи до раскидања комплекса протеина са липидима, пигментима, целулозом, хемицелулозом и лигнином, што ће омогућити ослобађање протеина и пигмената, а самим тим повећања приноса мембранских „зелених протеина“. Применом различитих метода изолације омогућиће се поређење њихових принципа и процена погодности за различите примене. Ефикасност изолације биће процењена на основу материјалног биланса протеина и суве материје и приноса. На основу резултата креираће се Сенкијеви (Sankey) дијаграми, који ће приказати дистрибуцију протеина током изоловања у односу на суву материју.

Добијени протеински прах биће окарактерисан испитивањем хемијског и аминокиселинског састава, као и дигестибилности, на основу чега ће се одредити његова нутритивна вредност. Анализираће се FTIR (eng. Fourier Transform Infrared Spectroscopy) спектар, антиоксидативна активност, функционална својстава протеина (емулгујућа својства, капацитет везивања воде и уља, растворљивост протеина уз одређивање изоелектричне тачке), садржај укупних фенолних једињења, као и утицаја на људски организам анализом антинутритивних фактора и дигестибилности. Крајњи исход ових испитивања је одабир методе изолације зелених протеина у зависности од приноса и карактеристика добијеног праха.

Модификација зелених протеина различитим методама, укључујући примену ултразвука, „pH-shift” третмана, Мајарове реакције и ензимске хидролизе, пружа могућност побољшања њихових сензорних и функционалних својстава као што су растворљивост, емулговање и стабилност. Осим тога, ови процеси могу значајно побољшати стабилност производа у праху током складиштења. Како је показано у литератури, биоактивни пептиди поседују различите антиоксидативне активности, док Мајарови производи успоравају липидну пероксидацију и формирање испарљивих једињења непријатног мириса. Испитаће се утицај ултразвука високог интензитета и микроталаса у контролисаним условима (уређај са ултразвучном сондом и микроталасни реактор) на растворљивост и емулгациона својства третираних протеина. При томе ће се варирати дужина и режим третмана, фреквенца, амплитуда, снага, врста растварача, састав протеинске смеше. Хемијски третман обухвата примену „pH-shift” методе уз варијацију рН вредности, температуре и времена инкубације. Посебно ће се испитати могућност побољшања растворљивости, емулгационих својстава и антиоксидативне активности изолованих протеина применом Мајарове реакције при различитим условима, али и комбинацијом ултразвучног третмана и ове реакције. Промене у секундарним структурама протеина и гликованих протеина пратиће се снимањем CD спектра у далекој UV области, али и применом FTIR и Раманове спектроскопије. На основу ових анализа, биће донети закључци о повезаности структурних промена и функционалних својстава модификованих протеина.

Степен хидролизе протеина и садржај слободних аминокиселина одредиће се ортофталалдехид (ОПА) и рН-стат методом, док ће се формирање Мајарових производа пратити спектрофотометријским и спектрофлуориметријским методама. Степен површинске хидрофобности молекула одредиће се такође флуориметријском методом, на основу везивања хидрофобне пробе, АНС (1-анилинонафтален-8-сулфоната), за протеин. Садржај укупних и реактивних сулфхидрилних група одредиће се са или уз дериватизацију са Елмановим реагенсом по стандардном протоколу. Антиоксидативна активност гликованих протеина и биоактивних пептида ће се мерити помоћу више *in vitro* метода и то на основу мерења способности неутрализације АБТС радикалног катјона (2,2'-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)), неутрализације хидроксилног радикала (метода са α -деоксирибозом), као и способности хелирања јона метала, док ће се њихова способност у спречавању оксидације липида испитати у тесту са тиобарбитурном киселином и хомогенизатором жуманцета као извором липида.

Модификовани протеини ће се користити као емулгатори у оптимизованим емулзионим системима, са и без биоактивне компоненте, при чему ће се испитати параметри као што су однос воде и уља, концентрација протеина, тип уљане фазе и брзина хомогенизације. Циљ је развој наноемулзија погодних за примену у храни, које ће се карактерисати на основу стабилности, величине и зета потенцијала честица, степена инкапсулације и другим параметрима, уз примену микроскопских анализа.

5. Очекивани научни допринос

Израдом предложене докторске дисертације очекује се више значајних научних доприноса који ће представљати солидну основу за даља истраживања недовољно испитане зелене протеинске фракције из лисне биомасе. Посебан значај представља детаљна анализа зелених протеина, која ће омогућити боље дефинисање њиховог потенцијала за примену у

формирању наноемулзија и инкапсулацији биоактивних једињења. Модификацијом зелених протеина применом различитих физичко-хемијских и биотехнолошких поступака, као и њиховом комбинацијом, испитаће се утицај различитих метода и процесних параметара на њихова својства, што до сада није било наведено у литератури. По први пут, посебна пажња биће усмерена на анализу структурних промена зелених протеина, што је од изузетне важности за разумевање њихових функционалних својстава. Очекује се и допринос даље анализе зелених протеина путем њихове инкорпорације у емулгујуће системе, чиме се надовезује на постојећа научна истраживања.

Научни доприноси ове докторске дисертације се могу сумирати на следећи начин:

- дефинисање технолошке шеме за истовремено изоловања „беле” и „зелене” фракције протеина, чиме се обезбеђује искоришћење обе протеинске фракције лисних протеина;
- утврђивање оптималних услова изолације протеина, у циљу добијања функционалних мембранских протеина;
- карактеризација зелене нерастворљиве протеинске фракције, укључујући анализу њених функционалних својстава;
- поређење ефеката модификације зелених мембранских протеина различитим третманима и допринос истраживању до сада неиспитаних приступа, чиме се отварају нове могућности примене и развијају одрживе технологије у биотехнолошким и индустријским процесима;
- утврђивање структурних промена зелених протеина током модификације и успостављање корелације између структуре молекула и њихових функционалних својстава (растворљивости и емулгујућих својстава);
- испитивање могућности и утврђивање услова формирања емулзионих система применом модификованих зелених протеина као емулгатора;
- дефинисање оптималних услова за формирање наноемулзија, са потенцијалном применом у инкапсулацији биоактивних једињења;
- утврђивање механизма ослобађања биоактивног једињења и дефинисање модела кинетике отпуштања.

6. План истраживања и структура рада

У складу са претпостављеним планом, предвиђа се да ће у докторској дисертацији бити обрађена следећа поглавља: *Увод*, *Теоријски део*, *Експериментални део*, *Резултати и дискусија*, *Закључак и литература*.

У поглављу *Увод*, дефинисаће се предмет и значај истраживања ове докторске дисертације, при чему ће се важност теме поткрепити освртом на актуелне глобалне изазове.

У поглављу *Теоријски део*, детаљно ће се анализирати доступна литература везана за лисне протеине, са нагласком на зелену протеинску фракцију (типови протеина, структура, биолошка улога). Како зелени протеини спадају у мембранске протеине, разматраће се њихови недостаци који лимитирају примену, као и могућа решења поређењем са сличним протеинским системима. Даље ће бити дат критички осврт на познате методе изолације лисних протеина и њихову примену. Потом ће се извршити детаљна анализа физичко-хемијских и биолошких третмана протеина, са фокусом на модификацију биљних протеина. На крају, посебна пажња биће посвећена примени биљних протеина као

емулгатора, уз детаљну анализу емулзионих система са нагласком на наноемулзије и инкапсулацију биоактивних једињења.

У поглављу *Експериментални део* биће описане следеће ставке:

- материјали коришћени током истраживања у овој докторској дисертацији;
- опрема коришћена током експерименталних истраживања;
- методе примењене током експерименталног рада;
- изолација и материјални биланс протеина и суве материје током изоловања;
- карактеризација зелене протеинске фракције у погледу хемијског састава, нутритивне вредности, антиоксидативне активности, функционалних својстава протеина и дејства на људски организам;
- оптимизација третмана структурне модификације протеина ради унапређења њихових функционалних својстава применом различитих механизма дејства физичког, хемијских и ензимских третмана;
- анализа удруженог ефекта третмана са различитим механизмима дејства на протеин;
- анализа структурних промена модификованих протеина;
- инкорпорација модификованих протеина у емулгујуће системе;
- дефинисање протеинских наноемулзија и њихова примена у инкапсулацији биоактивних једињења.

У поглављу *Резултати и дискусија* приказаће се добијени резултати експерименталног дела уз њихово објашњење и дискусију. Резултати изолације протеина приказаће се преко материјалних биланса и расподеле протеина добијених применом различитих метода изолације, уз карактеризацију добијеног протеинског праха. Такође, разматраће се могућност комбинације метода и увођења додатних корака изолације протеина. Након одабира оптималних корака изолације, у зависности од приноса зелених протеина као и њихове функционалности, добијени прах ће се даље анализирати.

Приказаће се утицај третмана на основу анализе функционалних својства зелених протеина. Испитаће се учинак три различита механизма дејства, као и њихових комбинација на структуру и функционална својства протеина. Промене структуре модификованих протеина биће анализиране и дискутоване у корелацији са функционалним својствима и утврдиће се оптимални услови третмана. Приступиће се детаљној анализи емулгујућих својстава модификованих протеина, уз могућност увођења предтретмана ради формирања система наноемулзија.

У поглављу *Закључак* биће представљени целокупни резултати везани за изолацију и модификацију зелених протеина и њихову примену као емулгатора. Такође, изнеће се закључци на основу добијених резултата, као и предлози за даља истраживања ове протеинске фракције.

У поглављу *Литература* цитираће се радови који су допринели изради ове докторске дисертације, укључујући: књиге, научне радове као и претходне експерименталне податке.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног и предложеног нацрта докторске дисертације, Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације кандидата Марије Корићанац, под називом ***Изолација и ензимска модификација мембранских протеина из отпадне лисне биомасе за примену у наноемулзијама и инкапсулацији активних једињења***, научно заснована и представља оригиналан научни допринос у ужој научној области Биохемијског инжењерства и биотехнологије. Комисија сматра да је кандидат подобан за реализацију предвиђених циљева истраживања докторске дисертације и предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да прихвати и одобри израду докторске дисертације под наведеним називом. Такође, Комисија предлаже да се упути захтев Већу научних области техничких наука, Универзитета у Београду за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. За ментора се предлаже др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 4. 12. 2024.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-
металуршки факултет

.....
Др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-
металуршки факултет

.....
Др Јелена Мијалковић, научни сарадник
Универзитета у Београду, Технолошко-
металуршки факултет

.....
Др Мирјана Антов, редовни професор
Универзитета у Новом Саду, Технолошки
факултет