

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/252
(Број захтева)

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ НАУКА
(Назив већа научне области и коме се захтев упућује)

27.05. 2016.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

АНДРЕА (Боривоје) СТЕФАНОВИЋ, мастер инж.

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање: **Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет**

3. Година дипломирања: **2010.**

4. Назив и седиште факултета на коме је стекао мастер образовање: **Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет**

4. Година дипломирања: **2011.**

5. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена: /

Година одбране магистарске тезе: /

Студент је уписан на докторске академске студије шк. 2011/2012. године.

Обавештавамо Вас да је **Наставно-научно веће,**
(назив надлежног тела Факултета)

на седници одржаној **26.05.2016. године** размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата Андреу Боривоја Стефановић

Име и презиме ментора: Зорица Кнежевић-Југовић

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Jakovetić, S., Luković, N., Jugović, B., Gvozdenović, M., Grbavčić, S., Jovanović, J., Knežević-Jugović, Z., Production of Antioxidant Egg White Hydrolysates in a Continuous Stirred Tank Enzyme Reactor Coupled with Membrane Separation Unit (2015) Food and Bioprocess Technology, 8 (2), pp. 287-300. IF(2014) 2,691; ISSN: 1935-5130; DOI: 10.1007/s11947-014-1402-y;
2. Stefanović, A.B., Jovanović, J.R., Grbavčić, S.Ž., Šekuljica, N.Ž., Manojlović, V.B., Bugarski, B.M., **Knežević-Jugović, Z.D.**, Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production (2014) European Food Research and Technology, 239 (6), pp. 979-993. IF(2014) 1,559; ISSN: 1438-2377; DOI: 10.1007/s00217-014-2295-8
3. Jakovetić, S.M., Luković, N.D., Bošković-Vragolović, N.M., Bezbradica, D.I., Picazo-Espinosa, R., **Knezevic-Jugovic, Z.D.**, Comparative study of batch and fluidized bed bioreactors for lipase-catalyzed ethyl cinnamate synthesis (2013) Industrial and Engineering Chemistry Research, 52 (47), pp. 16689-16697. IF(2014) 2,587; ISSN: 0888-5885; DOI: 10.1021/ie402069c
4. Milašinović, N., **Knežević-Jugović, Z.**, Jakovljević, Ž., Filipović, J., Kalagasidis Krušić, M. Synthesis of n-amyl isobutyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized into poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels (2012) Chemical Engineering Journal, 181-182, pp. 614-623. IF(2013) 4,058; ISSN: 1385-8947; DOI: 10.1016/j.cej.2011.11.115.
5. Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadžić, I., **Knezevic-Jugovic, Z.**, Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance (2011) Bioresource Technology, 102 (24), pp. 11226-11233. IF(2011) 4,890; ISSN: 0960-8524; doi:10.1016/j.biortech.2011.09.076

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничкотехнолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 16.05.2016.

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ДП

На основу чл. 30. став 3. Закона о високом образовању, чл. 40. Статута ТМФ-а и чл. 32. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 26.05.2016. 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 АНДРЕЕ СТЕФАНОВИЋ мастер инж., под називом: „Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“.

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 на сагласност, кандидату, ментору, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Predmet: Podobnost teme i kandidata **Andree Stefanović, master inženjera tehnologije**, za izradu doktorske disertacije

Odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta br. 35/97 od 03.03.2016. godine, imenovani smo za članove Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata **Andree (Borivoje) Stefanović, master inženjera tehnologije**, za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme pod nazivom:

„Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta“

Na osnovu materijala priloženog uz Zahtev kandidata, Komisija podnosi sledeći

REFERAT

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografski podaci

Andrea (Borivoje) Stefanović, master inženjer tehnologije, rođena je 5. januara 1987. godine u Gradačcu. Osnovnu školu, gimnaziju i srednju muzičku školu završila je u Bijeljini. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu (na studijskom programu Biotehnologija i biohemijско inženjerstvo) Univerziteta u Beogradu upisala je 2006. godine. Diplomirala je na istom fakultetu 22.9.2010. odbranom diplomskog rada pod nazivom „Proizvodnja mleka bez laktoze pomoću beta-galaktozidaze” sa ocenom 10 (deset) i prosečnom ocenom u toku studija 8,38, čime je stekla zvanje diplomirani inženjer tehnologije. Master akademske studije, na studijskom programu Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je 2010. godine. 26.9.2011. završila je master akademske studije na istom fakultetu odbranom master rada pod nazivom „Kovalentna imobilizacija penicilin acilaze iz *Escherichia coli* na makroporoznom kopolimeru glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata“ sa ocenom 10 (deset) i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,25, čime je stekla zvanje master inženjer tehnologije. Diplomski rad, kao i master rad, radila je na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta.

Doktorske studije, na studijskom programu Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je 2011. godine. Položila je sve ispite predviđene nastavnim planom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,82.

Član je *Srpskog hemijskog društva* od 2013. godine.

1.2. Stečeno naučno-istraživačko iskustvo

Ispite na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 9,82, a 14. oktobra 2013. godine odbranila je i Završni ispit sa ocenom 10.

Spisak položenih ispita na doktorskim studijama:

Naziv predmeta	ESPB	Ocena
Hemijska kinetika	5	9
Imobilisani biokatalizatori: tehnike imobilizacije, bioreaktori i primena	6	10
Odabrana poglavlja matematičke analize	5	10
Odabrana poglavlja biohemije - vitamini	5	10
Biohemijska kinetika	5	10
Biomasa kao izvor energije	4	10
Sanitarna mikrobiologija	4	10
Elektrohemijski i alternativni izvori električne energije	5	10
Odabrana poglavlja instrumentalne analize	7	9
Industrijska mikrobiologija	5	10
Engleski jezik		10
Završni ispit	30	10
Ukupno	81	9,82

Od 1.1.2012. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III46010, pod nazivom „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“. Od školske 2015/2016. godine angažovana je na izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta Enzimsko inženjerstvo na osnovnim studijama. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je 10.7.2012. godine, a u zvanje istraživač saradnik 9.4.2015. godine.

Kao koautor objavila je dva rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), dva rada u međunarodnom časopisu (M23), jedan rad u međunarodnom časopisu odlukom Matičnog odbora (M24), jedan rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51), osamnaest saopštenje na skupovima i to: osam radova saopštenih na međunarodnom skupu štampana u celosti (M33), tri rada saopštena na nacionalnom skupu štampana u celosti (M63) i osam radova saopštenih na međunarodnom skupu štampana u izvodu (M34). Svi publikovani radovi su proizašli kao rezultat angažovanja kandidata u okviru projekata finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Uradila je i jednu recenziju za časopis Hemijska industrija.

U čitavom ovom periodu učestvovala je u izvođenju i izradi 15 diplomskih i master radova studenata i pokazala je taktičnost, razumevanje i sposobnost da studente zainteresuje za istraživački rad i sa njima uspostavi korektan odnos uz uzajamno poštovanje.

Spisak objavljenih naučnih radova i saopštenja

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja - M20

- Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu - M21

1. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Dragana Z. Dragana Z. Čičkarić, Dušan Ž. Mijin and Zorica D. Knežević-Jugović, „Decolorization of Anthraquinonic Dyes from Textile Effluent Using Horseradish Peroxidase: Optimization and Kinetic Study”, *The Scientific World Journal*, vol. 2015, Article ID 371625, ISSN: 1532 2246, (IF(2013)=1,219; Multidisciplinary Sciences 16/55).
2. Zorica D. Knežević-Jugović, Milena G. Žuža, Enis S. Džunuzović, Sonja M. Jakovetić, **Andrea B. Stefanović**, Katarina B. Jeremić, Slobodan M. Jovanović, „An approach for the improved immobilization of penicillin G acylase onto macroporous poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenglycoldimethacrylate) as a potential industrial biocatalyst”, *Biotechnology Progress*, 32 1 (2016) 43-53, ISSN: 1520-6033, (IF(2014)=2,149; Food Science & Technology 30/123).

- Rad u istaknutom međunarodnom časopisu - M22

1. **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Sanja Ž. Grbavčić, Nataša Ž. Šekuljica, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović, „Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production”, *European Food Research and Technology*, 239 6 (2014) 979-993, ISSN: 1438-2377, (IF(2014)=1,559; Food Science & Technology 53/122).

- Rad u međunarodnom časopisu - M23

1. Nataša Ž. Šekuljica., Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Sanja Ž. Grbavčić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, „Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye”, *Hemijska industrija*, 2015, (IF(2014)=0,364; Engineering, Chemical 121/134), doi:10.2298/HEMIND150220028S.
2. Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Sonja M. Jakovetić, Nataša Ž. Šekuljica, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović, „Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration”, *Hemijska industrija*, 2016, (IF(2014)=0,364; Engineering, Chemical 121/134), doi:10.2298/HEMIND150506047J.

- Naučni rad objavljen u međunarodnom časopisu verifikovan odlukom Matičnog odbora - M24

1. Zorica Knežević-Jugović, **Andrea Stefanović**, Milena Žuža, Stoja Milovanović, Sonja Jakovetić, Verica Manojlović, Branko Bugarski, „Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins”, *Acta Periodica Technologica*, 43, 2012, pp. 33-41, ISSN: 1450-7188.

Radovi objavljeni u vodećim časopisima nacionalnog značaja - M51

1. Dragana Mladenović, Jelena Pejin, Sunčica Kocić-Tanackov, **Andrea Stefanović**,

Aleksandra Đukić-Vuković, Ljiljana Mojović, (2016), Potato stillage and sugar beet molasses as a substrate for production of lactic acid and probiotic biomass, *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 20 (1), 2016, pp. 17-20, ISSN 1821-4487.

Zbornici međunarodnih naučnih skupova - M30

- Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini - M33

1. Zorica D. Knežević-Jugović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Mirjana G. Antov, Picazo Espinosa Rafael, Verica Manojlović, Branko Bugarski, „Enzymatic Production of Bioactive Protein Hydrolysates from Egg White: Effects of Egg White Protein Pretreatment”, *Proceedings of the 39th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 21-25. May, 2012, Proceedings, p. 1419-1425, ISBN 978-80-89475-04-9.
2. Zorica Knežević-Jugović, **Andrea Stefanović**, Milena Žuža, Branimir Jugović, Milica Gvozdenović, Mirjana Antov, Branko Bugarski, „Functionality and antioxidant properties of hydrolysates of egg white proteins as influenced by type of protease”, *Proceedings of the 3rd International Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, M. Gligorić, ed., Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 4-6. March, 2013, Proceedings, p. 678-685, ISBN 978-99955-81-11-4.
3. Zorica Knežević-Jugović, Ana Gluović, Milena Žuža, **Andrea Stefanović**, Milica Gvozdenović, Branimir Jugović, Mirjana Antov, „Effects of hydrolysis degree and type of protease on antioxidant activity and functionality of egg white protein hydrolysates”, *Proceedings of the 40th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 27-31. May, 2013, Proceedings, p. 1432-1439, ISBN 978-80-89475-09-4.
4. Zorica Knežević-Jugović, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Milena Žuža, Sanja Grbavčić, Sonja Jakovetić, Marina Dojčinović, Nevena Luković, „Ultrasound-induced changes in functional properties of egg white proteins and in their susceptibility to enzymatic hydrolysis”, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 41st International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, p. 126–135, 26-30 May 2014, ISBN 978-80-89475-13-1.
5. **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Marina Dojčinović, Steva Lević, Milena Žuža, Viktor Nedović, Zorica Knežević-Jugović, „Impact of high-intensity ultrasound probe on the functionality of egg white proteins”, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, Vol. 6, 2014, p. 215-224, UDC 637.413.054.
6. Zorica D. Knežević-Jugović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Nataša Ž. Šekuljica, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, „Antioxidant activity of peptide fractions obtained by membrane ultrafiltration of egg white protein enzymatic hydrolysates“, Editor: Gligorić, M., In *Proceedings of the IV Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04-06. march 2015, p. 278-287, CD Proceedings, ISBN 978-99955-81-18-3.
7. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, „Kaolin as a support for the immobilization of horseradish peroxidase: application in anthraquinonic dyes decolorization from wastewater“, Editor: Gligorić, M., In *Proceedings of the IV Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04-06. march 2015, p. 287-292, CD Proceedings, ISBN 978-99955-81-18-3.

8. Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Sanja Grbavčić, Nataša Šekuljica, Mohamed Elmalimadi, Branko Bugarski, Zorica Knežević-Jugović, „Peptides with improved antimicrobial activity screened by membrane ultrafiltration from egg white protein hydrolysates“, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, p. 732–739, 25-29 May 2015, ISBN 978-80-89475-14-8.

- Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu - M34

1. Milica Carević, Marija Stojanović, Mladen Mihailović, **Andrea Stefanović**, Sanja Grbavčić, Zorica Knežević-Jugović, Dejan Bezbradica, „The immobilization of β -galactosidase on chemically modified immobilization supports“, *2nd FCUB Workshop Food Technology and Biotechnology*, 18.-19. oktobar 2011, Beograd, P-26
2. **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Ana Gluvić, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović, „Kinetic model of the hydrolysis of egg white proteins by Alcalase“, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., p. 235., CD Proceedings, ISBN 987-86-7132-053-5.
3. Zorica Knežević-Jugović, Milena Žuža, Ana Gluvić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Verica Manojlović, Branko Bugarski, „Biochemical and functional properties of egg white hydrolysates produced by different proteases“, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., str. 232. CD Proceedings, ISBN 987-86-7132-053-5.
4. Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Milica Carević, Zorica Knežević-Jugović, „The kinetic study of oleyl cinnamate synthesis“, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., str. 246., CD Proceedings, ISBN 987-86-7132-053-5.
5. Nevena Luković, Sonja Jakovetić, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Nataša Šekuljica, Zorica Knežević-Jugović, „Production of antioxidative egg-white hydrolysates in a circle batch membrane reactor“, *7th Central European Congress Food-CEFood, Food Chain Intergadion*, Ohrid, Macedonia, 21-24 May 2014, Book of Abstract, p. 220, ISBN 987-608-4565-05-5.
6. Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Nataša Šekuljica, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović, „Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis“, *Food Quality & Safety, Health & Nutrition 1st Conference*, 27-29 November 2014, Skopje, Macedonia, Book of Abstract, p. 76, ISBN 978-608-4565-06-2.
7. Zorica Knežević-Jugović, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Sonja Jakovetić, Sanja Grbavčić, Mohamed Elmalimadi, Branko Bugarski, „Hydrolysis of egg white and wheat proteins with protease from bacillus licheniformis: fractionation and identification of bioactive peptides“, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, p. 753–753, 25-29 May 2015, ISBN 978-80-89475-14-8.
8. Aleksandra Đukić-Vuković, Dragana Mladenović, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Zorica Knežević-Jugović, Jelena Pejin, Ljiljana Mojović, „Ultrasound-assisted pretreatment of distillery stillage for lactic acid production“, *1st World Congress on*

Electroporation and Pulsed Electric Field in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies (incorporating The 3rd International Bio & Food Electrotechnologies Symposium and Bioelectrics 2015 - The 12th International Bioelectrics Symposium), Portorož, Slovenia, September 6 to 10, 2015, Wed-C1-P7, Programme and book of abstracts, p. 112, ISBN 978-961-243-284-3.

Zbornici naučnih skupova nacionalnog značaja- M60

- Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini - M63

1. **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Ana D. Gluvić, Verica B. Manojlović, Dejan I. Bezbradica, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović, „Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from egg white: effects of ultrasound on egg white proteins“, 50. *Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, CD sa objavljenim radovima, Beograd, 2012, BT P3, p. 186-190, ISBN 978-86-7132-049-8.
2. Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Milena Žuža, Nataša Šekuljica, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Zorica Knežević-Jugović, „Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije“, u: Vladimir Dasković i Dušan Marković (ur.): *XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak 07-08. Mart 2014., Zbornik radova, Vol. 19 (21), str. 281-285, ISBN 987-86-87611-31-3.
3. Milena Žuža, Ana Gluvić, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Zorica Knežević-Jugović, „Antioksidativna aktivnost hidrolizata belanceta i njegovih frakcija dobijenih membranskom ultrafiltracijom“, u: Vladimir Dasković i Dušan Marković (ur.): *XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak 07-08. Mart 2014., Zbornik radova, Vol. 19 (21), str. 275-279, ISBN 987-86-87611-31-3.

- Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu - M64

1. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, Obezbojavanje antrahinonskih boja peroksidazom izolovanom iz svežeg ekstrakta rena, 52. *Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Novi Sad, 29.i 30.maj 2015. Kratki izvodi radova, str. 100, ISBN 978-86-7132-056-6.

Tehničko-tehnološka rešenja i patent

1. Diana Bugarski, Zorica Knežević-Jugović, Ivana Okić Đorđević, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Sanja Grbavčić, Branko Bugarski, „Dijetetski supplement na bazi bioaktivnih peptide sa antioksidativnom i antitumorskom aktivnosti“, Zavod za intelektualnu svojinu, Beograd, Republika Srbija, *patentna prijava P-2015/0361*, 2015, u postupku priznavanja.

1.3. Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Uzimajući u obzir dosadašnji rad i rezultate ostvarene tokom poslediplomskih studija i u okviru naučno-istraživačkog rada na projektu III46010 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod rukovodstvom prof. dr Zorice Knežević-Jugović, **Andrea Stefanović**, master inž., pokazala je interes, izrazitu sklonost i sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. To se pre svega ogleda u samostalnom kreiranju i realizaciji istraživanja vezanih za temu doktorske

disertacije, kao i u radu unutar drugih oblasti istraživanja zastupljenim na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Iz oblasti istraživanja, iz koje se predlaže tema doktorske disertacije, do sada je objavila jedan naučni rad štampan u istaknutom međunarodnom časopisu, kao i više saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima, dok su dva rada u vrhunskom međunarodnom časopisu u pripremi. Kandidat poseduje i odlično znanje engleskog i ima iskustva u korišćenju različitih eksperimentalnih tehnika vezanih za izolaciju i identifikaciju proteina/peptida kao i nekoliko softverskih paketa za obradu podataka.

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da Andrea Stefanović, master inž., ispunjava sve potrebne uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

2. Predmet i cilj naučnog istraživanja

Predmet naučnog istraživanja u okviru predložene teme ove doktorske disertacije je razvoj novih enzimskih procesa za proizvodnju hidrolizata proteina belanceta kao visokokvalitetnih proteinskih dodataka hrani i napicima sa novim funkcionalnim vrednostima.

Iako proteini belanceta spadaju u veoma kvalitetne proteine zbog svog jedinstvenog aminokiselinskog sastava i velike biološke vrednosti, njihova šira komercijalna primena kao proteinskih dodataka ishrani je ograničena zbog alergenosti, nedovoljne digestivnosti, termolabilnosti, velike viskoznosti i drugih [1]. Kontrolisanom i parcijalnom hidrolizom prirodnih proteina mogu se unaprediti njihova fizičko-hemijska svojstva, smanjiti alergenost i osloboditi bioaktivni peptidi koji im dodeljuju dodatna svojstva funkcionalne hrane [2,3]. Međutim, razvoj efikasnog enzimskog procesa za dobijanje bioaktivnih hidrolizata odgovarajućih senzornih i funkcionalnih svojstava je složen zadatak i zahteva izbor i optimizaciju pretretmana supstrata, kao i adekvatni izbor jedne ili više proteaza, kao i optimizaciju enzimskog postupka.

U poređenju sa nativnim proteinima, hidrolizati su značajno svarljiviji, manje su viskozni, lakše se umešavaju, imaju veću rastvorljivost u vodi i smanjen alergeni potencijal. Nutritivni proteini dobijeni nakon parcijalne i kontrolisane enzimske hidrolize su nestabilna jedinjenja koja mogu da promene hemijsku strukturu, a samim tim i fiziološko dejstvo, tokom tradicionalne termičke obrade belanceta i same pripreme hidrolizata [4-6]. Često ovi proteini imaju gorak i neprijatan ukus, a mogu da zadrže i alergenost nakon procesa. Zbog ovih ozbiljnih nedostataka, proizvodnja hidrolizata sa potencijalnom funkcionalnom vrednosti zahteva primenu inovativnih tehnologija koje omogućavaju zadržavanje biološke aktivnosti i odabranih svojstava željene supstance tokom proizvodnje, bez obrazovanja neželjenih sporednih proizvoda i efekata.

Nove enzimske tehnologije zasnivaju se na primeni tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta i/ili proteolitičkih enzima umesto klasičnog termičkog postupka tretiranja belanceta, čime je izbegnuto stvaranje sporednih i drugih degradacionih nus proizvoda i omogućeno dobijanje proteina sa poboljšanim funkcionalnim svojstvima i velikom nutritivnom vrednošću [7-11]. Najveća prepreka za komercijalnu primenu hidrolizata proteina belanceta je, za sada, neadekvatan procesni pretretman pri obradi i sterilizaciji belanceta, koji dovodi do značajne promene boje, ukusa, funkcionalnosti i nutritivnih svojstava proizvoda. To je razlog zbog čega je primena tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta postala fokus interesovanja poslednjih godina [12-16]. Uticaju sonikacije na enzimsku hidrolizu proteina belanceta nije posvećeno dovoljno pažnje u literaturi, ali se primena ultrazvučnih talasa smatra brzom, efikasnom i pouzdanom tehnikom koja može dovesti do poboljšanja funkcionalnih svojstava proizvoda [17].

Osnovni cilj ove disertacije je da se doprinese razvoju enzimskog procesa hidrolize proteina belanceta i optimizaciji ultrazvučnog pretretmana kao adekvatnoj zameni za tradicionalni termički predtretman procesiranja proteina hrane u prehrambenoj industriji. Stoga se ciljevi istraživanja obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom mogu podeliti u nekoliko celina:

1. Utvrđivanje optimalnih procesnih parametara i načina izvođenja ultrazvučnog pretretmana belanceta sa aspekta strukture i funkcionalnih svojstava tretiranih proteina;
2. Uticaj primenjenog ultrazvučnog pretretmana na denaturaciju proteina belanceta praćenjem promene strukture proteina, morfologije i veličine agregiranih molekula proteina nakon pretretmana;
3. Optimizacija procesa enzimske hidrolize proteina belanceta primenom različitih vrsta proteaza, kako visokoprečišćenih, tako i komercijalnih smeša proteaza;
4. Podešavanje odgovarajućih procesnih parametara enzimske hidrolize proteina belanceta u cilju dobijanja hidrolizata sa poboljšanim senzornim, funkcionalnim i nutritivnim svojstvima;
5. Ispitivanje kinetike enzimske reakcije hidrolize proteina u šaržnom reaktoru u cilju dobijanja projektnih jednačina neophodnih za projektovanje i dizajn enzimskih reaktora;
6. Karakterizacija dobijenih enzimskih hidrolizata proteina belanceta sa aspekta molekulskih masa peptida i biološke aktivnosti;
7. Ispitivanje uticaja primenjenih posthidrolitičkih tehnoloških postupaka (koncentrovanje, sušenje, uklanjanje soli i gorčine) na funkcionalna svojstva hidrolizata proteina belanceta;
8. Karakterizacija dobijenih hidrolizata sa aspekta hemijskog sastava, organoleptičkih i senzornih osobina.

Na osnovu dobijenih rezultata biće moguće okarakterisati svojstva dobijenih hidrolizata proteina belanceta koja će biti objašnjenja strukturnim promenama unutar molekula proteina nastalim usled primene ultrazvučnog pretretmana. Analizom hemijskog sastava, organoleptičkih svojstava i mikrobiološke ispravnosti biće izvršena selekcija hidrolizata koji u skladu sa važećim normama i standardima mogu imati potencijalnu primenu u prehrambenoj industriji.

Literatura:

- [1] Mine, Y. (1995), Recent Advances in the Understanding of Egg White Protein Functionality. *Trend Food Sci Technol* **6**(7) pp 225-232.
- [2] Yuije, C., Bo, T., Bo, S., Mingruo, G. (2006), Enzymatic Hydrolysis Condition for Egg White Proteins, *Bull Facul Agric Niigata Univ* **58**(2) pp 143-146.
- [3] Adler-Nissen J. (1989), Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers p 427.
- [4] Van der Plancken I., Delattre M., Indrawati, Loey A.V., Hendrickx M.E.G. (2004), Kinetic Study oh the Changes in the Susceptibility of Egg White Proteins to Enzymatic Hydrolysis Induces by Heat and High Hydrostatic Pressure Pretreatment, *J Agric Food Chem* **52** pp 5621-5626.
- [5] Lei B., Majumder K., Shen S., Wu J. (2011), Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin, *Food Chem* **124**, pp 808-815.
- [6] Chen C., Chi Y., Xu W. (2012), Comparisons on the Functional Properties and Antioxidant Activity of Spray-Dried and Freeze-Dried Egg White Protein Hydrolysate, *Food Bioprocess Tecnol* **5** pp 2342-2352.

- [7] Van der Plancken I., Van Loey A., Hendrickx M.E. (2005), Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins, *Innov Food Sci Emerg Technol* **6** pp 11-20.
- [8] Mine Y., Tatsushi N., Haga N. (1990), Thermally induced changes in egg white proteins, *J Agric Food Chem* **38** pp 2122-2125.
- [9] Arzeni C., Martinez K., Zema P., Arias A., Perez O.E., Pilosof, A.M.R. (2012), Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality, *J Food Eng* **108** pp 463-472.
- [10] Gülseren I., Güzey D., Bruce B.D., Weiss J. (2007), Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions, *Ultrason Sonochem* **14** pp 173-183.
- [11] Martini, S., Walsh M.K. (2012), Sensory characteristics and functionality of sonicated whey, *Food Res Int* **49** pp 694–701.
- [12] Martini S., Walsh M.K. (2012), Sensory characteristics and functionality of sonicated whey, *Food Res Int* **49** pp 694–701.
- [13] Ozuna C., Paniagua-Martínez I., Castaño-Tostado E., Ozimek L., Amaya-Llano S.L. (2015), Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides, *Food Res. Int* **77** pp 685-696.
- [14] O'Sullivan J., Murray B., Flynn C., Norton I. (2016), The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins, *Food Hydrocolloid* **53** pp 141-154.
- [15] Yanjun S., Jianhang C., Shuwen Z., Hongjuan L., Jing L., Uluko H., Yanling S., Wenming C., Wupeng G., Jiaping L. (2014), Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate, *J Food Eng* **124** pp 11-18.
- [16] Morales R., Martínez K.D., Pizones Ruiz-Henestrosa V.M., Pilosof A.M.R. (2015), Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect, *Ultrason Sonochem* **26** pp 48-55.
- [17] Mason T.J. (1998), *Power ultrasound in food processing—the way forward*, In: Povey, M.J.W., Mason, T.J. (Eds.), *Ultrasound in Food Processing*. Thomson Science, London, UK, pp 22–25.

3. Polazne hipoteze

Prva polazna hipoteza od koje se polazi jeste ta da je veća komercijalna primena hidrolizata proteina belanceta za sada ograničena usled neadekvatnog procesnog tretmana pri obradi i sterilizaciji belanceta kao i hemijskoj hidrolizi proteina, koji dovede do značajne promene boje, ukusa, funkcionalnosti i nutritivnih svojstava proizvoda. Najviše negativnih propratnih efekata ima termički pretretman belanceta na visokim temperaturama pri kojem se odvija složena Majlardova i druge reakcije, što dovodi do tamnjenja i nastajanja jedinjenja sa toksičnim, mutagenim i teratogenim efektima. Takođe, tokom termičkog postupka u blago alkalnoj sredini dolazi do neselektivne i nekontrolisane hidrolize proteina, kao i njihove ireverzibilne denaturacije, tako da se značajno smanjuje i nutritivna vrednost proizvoda. Dodatni problem je što se u toku termičkog postupka ne smanjuje alergenost ovalbumina i drugih proteina belanceta (ovomukoid, lizozim ovotransferin), jer su alergeni hrane generalno rezistentni na toplotni tretman. Zbog toga, kao alternativa tradicionalnoj termičkoj obradi sve više se preporučuju netermički tretmani belanceta i enzimska hidroliza proteina, zbog velikog broja prednosti i

dugoročnih efekata proizvodnje koji se mogu postići. Neophodno je postići smanjenje alergenosti i povećanje svarljivosti proteina belanceta, ali uz očuvanje ostalih nutritivnih svojstava.

Enzimska hidroliza proteina kao i primena netermičkih tretmana poput tehnologije visokog pritiska, mikrotalasa ili ultrazvuka svakako nije nov problem i u literaturi postoji veliki broj radova i patenata koji razmatra ovu tematiku. Međutim, u navedenim radovima iz literature uglavnom su korišćeni model proteini belanceta (najčešće lizozim, ovalbumin i ovotransferin). Na osnovu uvida u literaturu, nema mnogo radova koji se bave primenom netermičkih pretretmana i enzimskom hidrolizom smeše svih proteina prisutnih u belancetu i upravo će istraživanja u okviru ove doktorske disertacije biti bazirana na ovom supstratu. Jedna od polaznih hipoteza jeste ta da dobijanje hidrolizata koji će istovremeno zadovoljiti više zahteva kao, na primer, zadržati odgovarajuća nutritivna svojstva uz smanjenu antinutritivnu aktivnost i poboljšana funkcionalna svojstva, nije jednostavan zadatak i zahteva primenu odgovarajućeg netermičkog tretmana kao i više od jedne proteaze u jednostepenom ili višestepenom enzimskom procesu. Stoga je najefikasnije proteine belanceta fizičko-hemijskim tretmanom „pripremiti“ za enzimsku hidrolizu, odnosno denaturisati, tako da se peptidne veze u unutrašnjosti molekula izlože dejstvu proteaza. Prilikom optimizacije enzimskog procesa hidrolize treba imati u vidu da su intaktni proteini belanceta nedostupni dejstvu proteaza bez prethodnog pretretmana koji može značajno uticati na njihova funkcionalna svojstva. Pored toga, primena pretretmana može dovesti do usložnjavanja i poskupljivanja celokupnog procesa. Zbog toga, treba da bude pažljivo optimizovana kako sa aspekta funkcionalnih svojstava proteina, tako i sa aspekta efekta na samu enzimsku hidrolizu i ukupne performanse procesa.

Tehnologija primene ultrazvuka srednjeg intenziteta (frekvenci od 16 do 100 kHz) može biti vrlo korisna kod minimalnog procesiranja proteinskih sirovina, jer se ograničava povišenje temperature tokom tretmana, i time omogućava očuvanje senzornih i nutritivnih svojstava komponenata. Prenos akustične energije kroz proizvod je brz i celovit, što omogućava redukciju ukupnog vremena obrade i manju potrošnju energije. Kada se putem tretiranja sirovine ultrazvukom unese tačno definisana, optimalna, količina toplotne i mehaničke energije, dobiće se obrađeni proteini rastvorljivi u vodi koji će biti lakše dostupni dejstvu proteolitičkih enzima i koji će imati željena funkcionalna svojstva. Mali broj radova koji se bave problematikom tretiranja proteina belanceta ultrazvukom pre enzimске proizvodnje hidrolizata ne razmatraju funkcionalna svojstva dobijenih proizvoda, kao ni uticaj pretretmana na strukturu i funkcionalnost proteina belanceta. Veoma je važno da u toku pretretmana ne dođe do neželjenih promena funkcionalnih svojstava kao, na primer, do stvaranja zamućenog, neprovidnog gela usled agregiranja molekula proteina, i usled toga smanjene rastvorljivosti proteina. Poznato je da tretiranje proteina visokim pritiskom ili ultrazvukom može dovesti do ovih neželjenih promena pod određenim uslovima, ali je, generalno, mehanizam delovanja pritiska ili ultrazvuka na proteine drugačiji nego mehanizam delovanja toplotom. Polazeći od hipoteze da ultrazvuk značajno utiče na sekundarnu, terciarnu i kvaternarnu strukturu proteina, od kojih je terciarna izuzetno važna za funkcionalnost proteina, kao i da dovodi do povećanja hidrofobnosti površine i broja sulfhidrilnih grupa na površini molekula koje su odgovorne za veći broj disulfidnih mostova i formiranje manjih agregata nego pod uticajem toplote, objašnjava se zašto se pod dejstvom ultrazvuka dobijaju rastvorljiviji proteini, veće konformacione pokretljivosti i dostupnosti proteazama. Takođe, neophodno je obratiti pažnju na frekvenciju i jačinu ultrazvučnih talasa, vrstu i konstrukciju uređaja za sonikaciju, kao i na vreme trajanja samog pretretmana.

Što se tiče funkcionalnih svojstva hidrolizata proteina, ona zavise od velikog broja faktora, od kojih su najvažniji vrsta i koncentracija proteaze, priprema i koncentracija supstrata, temperatura, pH, stepen hidrolize i način izvođenja procesa. U nekoliko istraživanja je pokazano da ograničena i kontrolisana hidroliza specifičnim proteazama dovodi do povećanja rastvorljivosti hidrolizata i sposobnosti penjenja, poboljšava emulgujuća i gelirajuća svojstva, ali i da prekomerna hidroliza pogoršava ova svojstva u poređenju sa nativnim proteinima. Isto tako, usled dejstva proteaza mogu se poboljšati senzorna svojstva proteina, ali treba voditi računa o tome da prekomerna hidroliza dovodi do oslobađanja gorkih peptida, čime se narušava ukus proizvoda. Stoga, stepen hidrolize je jedan od najvažnijih parametara procesa, pri čemu njegova optimalna vrednost zavisi od željenog cilja i neophodno je optimizovati za svaki specifičan protein/proteaza sistem.

Vodeći se gore pomenutim stavkama, u okviru ove doktorske disertacije definišće se procesni parametri pri pretretmanu proteina belanceta ultrazvukom koji su optimalni sa aspekta izvođenja enzimske hidrolize, ali i sa aspekta funkcionalnih svojstava nativnih proteina belanceta, ali i njihovih hidrolizata.

4. Naučne metode istraživanja

Promene u strukturi proteina belanceta nakon ultrazvučnog pretretmana pratiće se pomoću Ramanove i FTIR spektroskopije. Kao kontrolni uzorak koristiće se osušeni netretirani vodeni rastvor proteina belanceta. Ramanova spektroskopija odlično detektuje čak i veoma male promene u sekundarnoj strukturi proteina na osnovu promene intenziteta i položaja pikova, naročito u oblasti amida I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$), amida II ($1510-1560\text{ cm}^{-1}$) i amida III ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$). U slučaju korišćenja FTIR-spektroskopije potrebno je raditi u D_2O zbog preklapanja pikova u oblasti amida I i intenzivnog vibracionog pika vode na 1640 cm^{-1} .

Raspodela srednje veličine čestica i polidisperzni indeks proteina belanceta nakon odgovarajućeg ultrazvučnog pretretmana biće određeni pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.) uređaja. Zetasizer Nano ZS je uređaj kojim se vrši analiza difrakcije svetlosti u uzorku koji je pripremljen i kojim se može odrediti raspodela veličine čestica suspenzija i zeta-potencijal. Kao rezultat dobiće se srednja vrednost veličine čestica izražena u nm, kao i polidisperzni indeks PDI. Isti uređaj biće korišćen za određivanje zeta-potencijala ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta dajući informaciju o meri stabilnosti čestica unutar datog sistema.

Hidrofobnost ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta će se određivati spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra (Horiba FluoroMax[®] 4) prema originalnoj ili modifikovanoj metodi iz literature.

Enzimska reakcija hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta će se izvoditi u šaržnom reaktoru sa automatskom kontrolom temperature $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pH vrednosti $\pm 0,1$ uz kontrolisano mešanje i ostale hidrodinamičke uslove. Napredovanje i tok enzimske reakcije pratiće se na osnovu stepena hidrolize koji je direktno proporcionalan količini α -amino grupa koje se oslobode u toku reakcije i količini utrošene baze za održavanje konstantne vrednosti pH. Količina oslobođenih α -amino grupa će se kvantitativno određivati spektrofotometrijskom metodom uz korišćenje o-ftaldialdehida kao bojenog reagensa.

Uklanjanje soli iz hidrolizata nakon završene hidrolize biće obavljeno procesom dijalize pomoću creva za dijalizu.

U cilju dobijanja praškastih proizvoda svi hidrolizati biće osušeni tehnikom sprej sušenja i liofilizacijom i biće ispitan uticaj sprej sušenja i sušenja liofilizacijom na funkcionalna svojstva finalne formulacije proizvoda. Sva ispitivanja izvediće se prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature.

Morfologija ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta i njihovih hidrolizata biće određena tehnikom skenirajuće elektronske mikroskopije pomoću elektronskog mikroskopa (TESCAN MIRA3 XMU).

Od funkcionalnih i fizičko-hemijskih svojstava u okviru ove doktorske disertacije razmatraće se: kapacitet i stabilnost pene, emulgaciona svojstva, rastvorljivost, turbiditet, odnos ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa i grupa u unutrašnjosti molekula, svarljivost, redukujuća moć. Rastvorljivost i turbiditet proteina belanceta određivaće se spektrofotometrijski. Razblaženi uzorci (10% v/v) će se centrifugirati pri jako velikom broju obrtaja (15 minuta, 14,900 g na 4°C) da bi se staložili nerastvorni proteini. Nakon toga, analiziraće se sadržaj proteina u supernatantu i početnom uzorku standardnom metodom po Loriju i na osnovu njihovih odnosa odrediće se rastvorljivost proteina u tretiranom i netretiranom belancetu. Turbiditet rastvora ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta (10% v/v) razblaženih demineralizovanom destilovanom vodom meriće se na talasnoj dužini 650 nm. Kapacitet i stabilnost pene ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta i njihovih određivaće se na uređaju Yellowline, DI 25 basis, Ica Works Inc., Wilmington, 600 W, 50 V, 8000-24000 rpm). Ovaj metod se sastoji u snažnom mešanju uzorka na konstantnoj temperaturi i pri konstantnom velikom broju obrtaja, što prouzrokuje stvaranje pene, i očitavanju visine pene posle zaustavljanja mešanja. Kapacitet penjenja se izražava kao relativno povećanje zapremine odmah nakon završetka mešanja, dok se stabilnost pene izražava kao relativno povećanje zapremine pene 30 minuta nakon završetka mešanja. Emulgaciona svojstva određivaće se sprektrofotometrijskom metodom i biće izražena kroz indekse emulgacione aktivnosti i stabilnosti. Svarljivost i redukujuća moć meriće se spektrofotometrijski prema modifikovanim metodama iz literature.

Gorčina hidrolizata koji su prethodno osušeni sprej sušenjem i/ili liofilizacijom određivaće se na osnovu subjektivnog osećaja tri individue pri koncentraciji peptida 30 mg/cm³ i izražavati u jedinicama koncentracije rastvora kofeina iste gorčine.

Merenje koordinata boje osušениh i tabletiranih hidrolizata belanceta (CIE, L^* , a^* , b^*) biće određene pomoću Datacolor SF300 UV refleksionog spektrofotometra, koristeći izvor svetlosti D65 pri standardnom uglu posmatrača od 10°.

Sadržaj pepela, lipida, proteina i ukupnih ugljenih hidrata određivaće se pomoću AOAC standardnih metoda. Distribucija molekulske mase hidrolizata odrediće se pomoću gel-filtracione preparativne hromatografije na (Omnifit[®], Danberi, SAD, 250 mm i.d.×25 mm) koloni, kao i metodom SDS-PAGE elektroforeze koja će se izvoditi u jedinici za horizontalnu i vertikalnu elektroforezu (Amersham Biosciences).

5. Očekivani naučni doprinos

Rezultati dobijeni u toku rada na ovoj doktorskoj disertaciji daće značajan naučni doprinos objašnjenju mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa na strukturu proteina i njihovu korelaciju sa funkcionalnim svojstvima. Primena različitih ultrazvučnih uređaja, sa opsegom frekvencija od 20-40 kHz, kao i variranje uslova izvođenja samog pretretmana (snaga ultrazvučnih talasa, dužina trajanja pretretmana, radna temperatura) daće značajan naučni doprinos objašnjenju promene strukture proteina nastale usled kavitacionog dejstva ultrazvučnih talasa, formiranja/razlaganja

agregata proteina, kao i promene morfologije i veličine čestica pretretiranih proteina. Na osnovu uvida u literaturu, nema mnogo radova koji se bave primenom netermičkih pretretmana i enzimskom hidrolizom smeše svih proteina prisutnih u belancetu, uglavnom su korišćeni model proteini belanceta (najčešće lizozim, ovalbumin i ovotransferin) i upravo je ovo jedan od naučnih doprinosa u okviru ove doktorske disertacije. Sinergistički efekat ultrazvučnog pretretmana i naknadne enzimske hidrolize biće detaljno objašnjen i njihov uticaj na poboljšana funkcionalna svojstva proteina belanceta daće značajan doprinos u razumevanju mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa na denaturaciju proteina. Dobijeni rezultati mogu poslužiti kao osnova za uvođenje novih tehnoloških postupaka proizvodnje pojedinih prehrambenih proizvoda sa svrhom poboljšanja njihovih funkcionalnih, nutritivnih i organoleptičkih svojstava.

U okviru istraživanja može se očekivati nekoliko osnovnih doprinosa i to:

Razvoj originalnog tehnološkog postupka dobijanja hidrolizata proteina belanceta, što podrazumeva nekoliko pojedinačnih doprinosa:

- Nova saznanja o mogućnosti primene alternativnih postupaka za obradu proteina belanceta nasuprot konvencionalnom termičkom tretmanu;
- Optimizacija procesnih parametara pri obradi belanceta ultrazvukom visokog intenziteta;
- Uticaj ultrazvučnog pretretmana na strukturu, morfologiju i karakteristike čestica proteina belanceta;
- Optimizacija enzimske hidrolize proteina belanceta izborom jedne ili više proteaza kao biokatalizatora procesa;
- Podešavanje procesnih parametara enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu;
- Ispitivanje kinetike enzimske reakcije hidrolize proteina u cilju dobijanja projektnih jednačina neophodnih za projektovanje i dizajn šaržnog enzimskog reaktora za proizvodnju hidrolizata proteina belanceta;
- Funkcionalna karakterizacija dobijenih hidrolizata sa aspekta krajnje primene;
- Uspostavljanje korelacije između veličine čestica ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta i njihovih funkcionalnih svojstava;
- Potpuno okarakterisan hidrolizat proteina belanceta u tečnoj formi i osušen u vidu praha.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Osnovni cilj ove disertacije je da se doprinese razvoju enzimskog procesa hidrolize proteina belanceta i optimizaciji ultrazvučnog pretretmana kao adekvatnoj zameni za tradicionalni termički pretretman procesiranja proteina hrane u prehrambenoj industriji.

Predložena disertacija biće sačinjena iz četiri celine. Prva celina obuhvatiće ispitivanje uticaja osnovnih parametara ultrazvučnog pretretmana kao što su frekvencije ultrazvučnih talasa, snaga ultrazvuka, tip uređaja (ultrazvučno kupatilo, ultrazvučna sonda, protočni sistem sa ultrazvučnom sondom), temperatura i dužina trajanja pretretmana na stepen denaturacije proteina belanceta. U drugom delu ispitaće se mogućnost promene strukture proteina, morfologije čestica, kao i srednje raspodele veličine čestica usled primene odgovarajućeg ultrazvučnog pretretmana. Posebna pažnja biće posvećena i određivanju funkcionalnih svojstava u cilju pronalaženja odgovarajuće korelacije između primenjenog pretretmana i funkcionalnosti proteina belanceta.

Treća celina biće posvećena optimizaciji procesnih parametara i načinima izvođenja enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta. Takođe, odrediće se i kinetički model hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktoru, koji valjano opisuje tok reakcije i na osnovu koga se mogu predvideti stepeni hidrolize i sastavi hidrolizata u dužem vremenskom periodu. Poslednji deo ove doktorske disertacije biće posvećen dobijanju hidrolizata proteina u formi praha zbog lakšeg lagerovanja i veće stabilnosti pri skladištenju. Optimizovaće se proces sušenja različitim postupcima (liofilizacija i sprej sušenje) i dobijeni prahovi će se okarakterisati sa aspekta organoleptičkih, funkcionalnih, reoloških i fizičko-hemijskih svojstava. Posebna pažnja biće usmerena na očuvanje funkcionalnih svojstava dobijenih hidrolizata u toku sušenja, jer je upravo čitav enzimski proces, koji je prethodio sušenju, optimizovan sa ciljem dobijanja hidrolizata sa poboljšanom funkcionalnošću.

Predviđa se da će u doktorskoj disertaciji biti obrađena sledeća poglavlja: *Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura.*

U poglavlju *Uvod* biće prikazan kratak osvrt na oblast istraživanja i definišće se predmet istraživanja i aktuelnost problematike u svetu, kao i glavni ciljevi disertacije.

Poglavljje *Teorijski deo* obuhvatiće pregled literature u okviru dosadašnjih istraživanja na temu primene netermičkih pretretmana obrade proteina hrane, prvenstveno proteina belanceta, kao i istraživanja koja se odnose na strukturne promene izazvane primenom određenog pretretmana i enzimsku hidrolizu proteina kao način poboljšana funkcionalnih svojstava pretretiranih proteina belanceta. Takođe, poseban osvrt će biti dat na teorijski prikaz poznatih mehanizama delovanja, svojstva i klasifikaciju proteaza koje mogu da katalizuju reakciju hidrolize proteina.

U *Eksperimentalnom delu* biće navedeni materijali i metode primenjeni u eksperimentalnom radu:

- Materijali korišćeni u izradi doktorske disertacije;
- Opis opreme korišćene za eksperimentalna istraživanja;
- Prikaz tehnika i metoda za izvođenje eksperimenta;
- Metode za određivanje strukture proteina, morfologije i karakterizacije čestica (molekula proteina različitog stepena agregacije);
- Detaljan prikaz metoda za određivanje funkcionalnih svojstava proteina;
- Izvođenje empirijskog kinetičkog modela enzimske reakcije hidrolize u šaržnom reaktoru;
- Tehnike sušenja (sprej sušenje i liofilizacija);

U poglavlju *Rezultati i diskusija* biće prikazani i diskutovani dobijeni rezultati. Detaljno će biti upoređeni rezultati dobijeni primenom različitih vrsta ultrazvučnih uređaja. Dobijeni rezultati će se dalje upoređivati, a sve u cilju selekcije optimalne metode, tj. uslova pretretmana koji će najviše uticati na brzinu reakcije hidrolize i posledično na funkcionalne i strukturne promene. Rezultati predloženog istraživanja će se porediti sa relevantnim rezultatima dostupnim u naučnoj literaturi. U skladu sa tim, doneće se zaključci o potencijalnoj primeni ultrazvučno pretretiranih hidrolizata proteina belanceta u proizvodnji funkcionalnih proizvoda i dijetetskih suplemenata.

Ovo poglavljje sadržiće prikaz i diskusiju sledećih eksperimenata:

- Primena različitih vrsta ultrazvučnih uređaja u cilju denaturacije proteina belanceta;
- Uticaj dužine trajanja ultrazvučnog pretretmana na funkcionalna svojstva proteina belanceta;
- Ispitivanje uticaja ultrazvučnog pretretmana na strukturu, morfologiju i karakteristike proteina belanceta;
- Jednostepena i dvostepena enzimska hidroliza ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta;

- Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktoru;
- Funkcionalna svojstva hidrolizata dobijenih različitim postupcima pretretmana proteina belanceta i primenom različitih proteaza;
- Optimizacija i izbor tehnike sušenja ultrazvučno pretretiranih vodenih rastvora belanceta;
- Karakterizacija praškastih hidrolizata sa aspekta organoleptičkih, funkcionalnih i senzornih svojstava.

U *Zaključku* će biti sumirani dobijeni rezultati i izvedeni zaključci na osnovu upoređivanja sa literaturnim podacima.

U delu *Literatura* biće navedene reference citirane u disertaciji, uključujući i naučne publikacije proistekle iz istraživanja u okviru ove disertacije.

7. Zaključak i predlog

Na osnovu iznetog, Komisija smatra da je tema predložene doktorske disertacije kandidata Andree Stefanović pod nazivom „Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta“ naučno zasnovana i predlaže Nastavno-naučnom veću da je prihvati. Komisija, takođe smatra, da je kandidat podoban za realizaciju ove teze. Za mentora se predlaže prof. dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova.

U Beogradu 16.05.2016.

Komisija:

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Branko Bugarski, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Marica Rakin, vanredni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Sanja Grbavčić, naučni saradnik
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu d.o.o.

Dr Mirjana Antov, redovni profesor
Univerziteta u Novom Sadu, Tehnološki fakultet