

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/32
(Број захтева)

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

13.03.2017.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

ЈЕЛЕНА (Ранко) ЈОВАНОВИЋ, мастер инж. технологије

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

3. Година дипломирања: **2010.**

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

3. Година дипломирања: **2011.**

Обавештавамо Вас да је **Наставно-научно веће**, на седници одржаној **23.02.2017. године** размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације
3. Подаци о ментору.

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 23.02.2017. 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 ЈЕЛЕНИ ЈОВАНОВИЋ, мастер инжењеру технологије, под називом: „Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација“.

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

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата: **Јелену Р. Јовановић**

Име и презиме ментора: **Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић**

Звање: **Редовни професор, Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadžić, I., **Knežević-Jugović, 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. *Bioresource Technol.* 2011, 102(24): 11226-11233, ISSN:0960-8524, IF (2011) = 4,980, *Biotechnology and Applied Microbiology* (20/158)
2. Ognjanović, N., Bezbradica, D., **Knežević-Jugović, Z.**, Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technol.* 2009, 100(21):5146-5154, ISSN:0960-8524, IF (2008) = 4,453, *Enegry and Fuels* (2/67)
3. Jovanović, J.R., Stefanović, A.B., Šekuljica, N.Ž., Tanasković, S.M.J., Dojčinović, M.B., Bugarski, B.M., **Knežević-Jugović, Z.D.**, Ultrasound Pretreatment as an Useful Tool to Enhance Egg White Protein Hydrolysis: Kinetics, Reaction Model, and Thermodynamics. *J Food Sci.* 2016, 81(11):C2664-C2675, ISSN: 0022-1147, IF (2014) = 1,696, *Food Science and Technology* (49/124)
4. 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. *Food Bioprocess Tech.* 2015, 8(2):287-300, ISSN: 1935-5130, IF (2013) = 3,126, *Food Science and Technology* (12/122)
5. Stefanović, A.B., Jovanović, J.R., Grbavčić, S.Ž., Šekuljia, 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, *Eur Food Res Technol.* 2014, 239(6):979-993, ISSN: 1438-2377, IF (2014) = 1,559; *Food Science and Technology* (53/122).

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: 10. 2. 2017.

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

Предмет: Подобност теме и кандидата **Јелене Јовановић**, мастер инжењера технологије, за израду докторске дисертације

Одлуком бр.35/503 од 24. 11. 2016. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата **Јелене (Ранко) Јовановић** за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом:

„Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација“

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Јелена (Ранко) Јовановић, мастер инжењер технологије, рођена је 4. децембра 1987. године у Смедереву, Република Србија, где је завршила основну школу и гимназију. Школске 2006/2007. године уписала је студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија и дипломирала је 2010. године са просечном оценом током студија 8,26 (осам и 26/100). Завршни рад на тему „Производња протеаза из *Candida utilis* применом технике гајења на чврстим подлогама“ под руководством ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић одбранила је са оценом 10 (десет). Мастер академске студије на истом факултету, у оквиру студијског програма Биохемијско инжењерство и биотехнологија, профил Биохемијско инжењерство уписала је школске 2010/2011. године. Завршни мастер рад на тему „Ензимска синтеза етил-цинамата у реактору са флуидизованим слојем“ под руководством ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић одбранила је јула 2011. године са оценом 10 (десет) и мастер студије успешно завршила са просечном оценом 9,25 (девет и 25/100). Докторске студије, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, уписала је школске 2011/2012. године. Положила је све испите предвиђене наставним планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,55 (девет и 55/100) укључујући и Завршни испит са оценом 10 (десет).

Од марта 2012. године као стипендиста-докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја ангажована је на пројекту из програма интердисциплинарних студија, област Биотехнологија под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности (евиденциони број ИИИ 46010). Од 1. априла 2015. године запошљава се на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду у оквиру наведеног пројекта ИИИ 46010. У звање истраживач сарадник изабрана је 09. 07. 2015. године.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Јелена Р. Јовановић је школске 2011/2012. године уписала докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све испите предвиђене планом и програмом

докторских студија са просечном оценом 9,55 (девет и 55/100), а 14. октобра 2013. одбранила је и Завршни испит са оценом 10.

Положени испити на докторским студијама:

Редни број	Назив предмета	Оцена	ЕСПБ
1	Биохемијска кинетика	10	5
2	Одабрана поглавља математичке анализе	10	5
3	Одабрана поглавља биохемије-витамини	8	5
4	Санитарна микробиологија	10	4
5	Биоактивне материје у козметичким производима	10	4
6	Енглески језик	10	-
7	Одобрана поглавља инструменталне анализе	8	7
8	Површински активне материје	10	4
9	Имобилисани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	10	6
10	Хемијска кинетика	9	5
11	Индустријска микробиологија	10	5
12	Завршни испит	10	30
Просечна оцена/Збир бодова		9,55	80

У току докторских студија ангажована је у оквиру пројеката:

- „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, пројекат Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. ИИИ 46010 од марта 2012. до 01. априла 2015. као стипендиста-докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја. Априла 2015. запошљава се као истраживач-приправник на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду и наставља ангажовање на горе наведеном пројекту.
- „Развој нових ензимских технологија за модификацију сојиних протеина и унапређење њихових функционалних својстава“ (ЕУРЕКА пројекат, бр. Е!9936 - SOYZYME) од октобра 2016. године.

Као први аутор и коаутор објавила је два рада у врхунском међународном часопису (М21), три рада у истакнутим међународним часописима (М22), два рада у међународном часопису (М23), један рад у водећем часопису националног значаја (М51), један рад у истакнутом часопису националног значаја (М52), двадесет саопштења на скуповима и то: шест радова саопштених на међународном скупу штампана у целини (М33), три рада саопштена на националном скупу штампана у целини (М63) и једанаест радова саопштених на међународном скупу штампана у изводу (М34). Исто тако као коаутор објавила је поглавље у монографији међународног значаја (М13). Сви публиковани радови су произашли као резултат ангажовања кандидата у оквиру пројеката финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Школске 2015/2016. и 2016/2017. године била је ангажована на извођењу експерименталних вежби из предмета Ензимско инжењерство на основним академских студијама. У читавом овом периоду учествовала је у извођењу и изради укупно 18 завршних и мастер радова студената и показала је тактичност, разумевање и способност да студенте

заинтересује за истраживачки рад и са њима успостави коректан однос уз узајамно поштовање.

Списак објављених и саопштених научних и стручних радова

1. Поглавље у монографији међународног значаја (M13)

1. Knežević Jugović, Z.D., Grbavčić S.Ž., **Jovanović, J.R.**, Stefanović, A.B., Bezbradica, D.I., Mijin, D.Ž. and Antov M. Covalent immobilization of enzymes on Eupergit® supports: Effect of the immobilization protocol. In: *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Ed. Shelley D. Minter, Springer, New York, 2017, ISSN: 1064-3745, ISBN: 978-1-4939-6497-0, pp 75-91.

2. Радови објављени у научним часописима међународног значаја (M20)

2.1. Радови објављени у врхунским часописима међународног значаја (M21)

1. Jakovetić, S., Luković, N., Jugović, B., Gvozdenović, M., Grbavčić, S., **Jovanović, J.**, Knežević-Jugović, Z., (2015) Production of antioxidant egg white hydrolysates in a continuous stirred tank enzyme reactor coupled with membrane separation unit, *Food Bioprocess Tech.* 8(2):287-300, ISSN: 1935-5130, IF (2013) = 3,126, *Food Science and Technology* (12/122).
2. Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Dojčinović, M., Lević, S. Nedović, V., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z., (2017) Effect of the controlled high intensity ultrasound on improving functionality and structural changes of egg white proteins, *Food Bioprocess Tech.*, ISSN: 1935-5130, IF (2015) = 2,574, *Food Science and Technology* (27/125). *article in press*, doi:10.1007/s11947-017-1884-5

2.2. Радови објављени у истакнутим часописима међународног значаја (M22)

1. **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Tanasković, S. M. J., Dojčinović, M. B., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Ultrasound Pretreatment as an useful tool to enhance egg white protein hydrolysis: Kinetics, reaction model, and thermodynamics. *J Food Sci.* 81(11):C2664–C2675, ISSN: 0022-1147, IF (2014) = 1,696, *Food Science and Technology* (49/124).
2. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Djokić, V. R., Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin, *Bioprocess Biosyst Eng.* 39(3):461-472, ISSN: 1615-7591, IF (2014) = 1,997, *Biotechnology and Applied Microbiology* (86/163)
3. Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Grbavčić, S. Ž., Šekuljica, N. Ž., Manojlović, V. B., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., (2014) Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production, *Eur Food Res Technol.* 239(6):979-993, ISSN: 1438-2377, IF (2014) = 1,559; *Food Science and Technology* (53/122).

2.3. Радови објављени у часописима међународног значаја (M23)

1. **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Milena, Ž. G., Jakovetić, S. M., Šekuljica, N. Ž., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration, *Hem Ind.* 70(4):419-428, ISSN: 0367-598X, IF (2015) = 0,437; *Engineering, Chemical* (118/135)
2. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Grbavčić S. Ž., Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye, *Hem. Ind.* 70(2):217-224, ISSN: 0367-598X, IF (2015) = 0,437; *Engineering, Chemical* (118/135)

3. Радови објављени у часописима националног значаја (M50)

3.1. Рад објављен у водећем часопису националног значаја (M51)

1. Djukic-Vukovic, A., Mladenovic, A., **Jovanovic, J.**, Knezevic-Jugovic, Z., Kocic-Tanackov, S., Pejcin, J., Mojovic, Lj., (2016) Ultrasound as a physical treatment of stillage for lactic acid fermentation, *J Process Energ Agr.* 20(1):13-16, ISSN 1821-4487

3.2. Рад објављен у истакнутом часопису националног значаја (M52)

1. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Jakovetić, S. M., Knežević-Jugović, Z. D., Mijin, D. Ž., (2016) The oxidation of anthraquinone dye using HRP immobilized as a cross-linked enzyme aggregates, *Adv. Technol.* 5(2):18-26, ISSN 2406-3037

4. Зборници скупова међународног значаја (M30)

4.1. Саопштења са скупова међународног значаја штампана у целини (M33)

1. Knezevic-Jugovic, Z., Stefanovic, A., **Jovanovic, J.**, Zuza, M., Grbavcic, S., Jakovetic, S., Dojcinovic, M., Lukovic, N., 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, 126–135, 26-30 May 2014, ISBN: 978-80-89475-13-1
2. Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Dojčinović, M., Lević, C., Žuža, M., Nedovović, B., Knežević-Jugović, Z., (2014) Impact of high-intensity ultrasound probe on the functionality of egg white proteins, *JHED* 6:215-224, UDC 637.413.054
3. Knežević-Jugović, Z. D., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Žuža, M. G., Šekuljica, N. Ž., Manojlović, V. B., Bugarski, B. M., 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, 278-287, 04–06 March 2015, CD Proceedings, ISBN: 978-99955-81-18-3
4. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., 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, 287-292, 04-06 March 2015, CD Proceedings, ISBN: 978-99955-81-18-3
5. **Jovanović J.**, Stefanović, A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Elmalimadi, M., Bugarski, B., Knežević- Jugović, Z., 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, 732–739, 25-29 May 2015, ISBN 978-80-89475-14-8
6. Elmalimadi M., Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Šekuljica, N., Tanasković, S., Antov, M., Knežević-Jugović, Z., Functional improvements in wheat gluten through alcalase-assisted hydrolysis and thermal pretreatment, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 43th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, 874–882, 23-27 May 2016, ISBN 978-80-89597-35-2

4.2. Саопштења са скупова међународног значаја штампана у изводу (M34)

1. Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Gluvić, A., Jakovetić, S. Luković, N., Žuža, M., Knežević-Jugović, Z., 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., str 235., CD Proceedings, ISBN 987-86-7132-053-5
2. Knežević-Jugović, Z., Žuža, M., Gluvić, A., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Manojlović, V., Bugarski, B., 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
3. Jakovetić, S., Luković, N., Grbavčić, S., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Carević, M., Knežević-Jugović, Z., 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

4. Luković, N., Jakovetić, S., Grbavčić, S., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Šekuljica, N., Knežević-Jugović, Z., Production of antioxidative egg-white hydrolysates in a cycle batch membrane reactor, In: Vladimir Kakurinov, Prof. Dr (editor): *7 th Central European Congress on Food-CEFood*, Food Chain Intergadion, Ohrid, Macedonia, 21-24 May 2014, Book of Abstract, page 220, ISBN 987-608-4565-05-5
5. **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Jakovetić, S., Luković, L., Šekuljica, N., Žuža, M., Knežević-Jugović, Z., Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis, In: Vladimir Kakurinov (editor): *1st Conerence on Food Quality and Safety, Health and Nutrition-Nuticon 2014*, Book of Abstracts, 27-28 November 2014, Skopje, Macedonia, page 76, ISBN 987-608-4565-06-2
6. Knežević-Jugović, Z., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Jakovetić, S., Grbavčić, S., Elmalimadi, M., Bugarski, B., 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, 753–753, 25-29 May 2015, ISBN 978-80-89475-14-8
7. Djukić-Vuković, A., Mladenović, D., Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Knežević-Jugović, Z., Pejin, J., Mojović, Lj., 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, page 112, ISBN 978-961-243-284-3
8. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., Dekolorizacija antrahidronskih boja iz otpadnih voda imobilisanom peroksidazom iz rena, *XI simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj“*, Zbornik izvoda radova, str. 67, 22-24. 10. 2015, Leskovac, ISBN 987-86-89429-12-1
9. Jovanović, A., Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Trifković, K., **Jovanović, J.**, Nedović, V., Bugarski, B., Ultrasound Extraction of Polyphenolic Compounds from Thymus serpyllum, *29th EFFoST International Conference, Food Science and Innovation: Delivering sustainable solutions to the global economy and society*, 10-12 november 2015, Athens, Greece, Book of Abstract, page 1386, ISBN 978-618-82196-1-8 (Izdavač Elsevier B. V.)
10. **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Grbavčić, S. Ž., Jakovetić Tanasković, S. M., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., Antibacterial and antioxidant capacity of egg white hydrolysates screened from proteolysis-assisted high intensity ultrasound treatment, *2nd International Conference on Ultrasound-based Applications: from analysis to synthesis - ULTRASONICS 2016*, Caparica-Almada, Portugal, 6th-8th June 2016, Book of Abstracts, page 62, ISBN: 978-989-99361-9-5
11. Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Šekuljica, N. Ž., Grbavčić, S. Ž., Luković, N. D., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., Structural and functional characterization of papain-assisted ultrasound pretreated egg white hydrolysis, *2nd International Conference on Ultrasound-based Applications: from analysis to synthesis - ULTRASONICS 2016*, Caparica-Almada, Portugal, 6th-8th June 2016, Book of Abstracts, page 43, ISBN: 978-989-99361-9-5

5. Зборници скупова националног значаја (M60)

5.1. Саопштења са националних скупова штампана у целини (M63)

1. Grbavčić, S., Said, O. A., **Jovanović, J.**, Luković, N., Žuža, M., Bezbradica, D., Knežević-Jugović, Z., Proizvodnja lipaza i proteaza iz *Candida utilis* tehnikom gajenja na čvrstoj podlozi, *Biotehnologija za održivi razvoj*, Beograd, 24-26. Novembar 2010. str 49-52., CD sa objavljenim radovima, ISBN: 978-86-7401-269-7
2. **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Žuža, M., Šekuljica, N., Jakovetić, S., Luković, N., Knežević-Jugović, Z., Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije, u: Vladimir Dosković 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. Žuža, M., Gluvić, A., Jakovetić, S., Luković, N., Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Knežević-Jugović, Z., Antioksidativna aktivnost hidrolizata belanceta i njegovih frakcija dobijenih membranskom ultrafiltracijom, u: Vladimir Dosković 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

6. Техничко-технолошка решења и патенти

6.1. Пријављен патент на националном нивоу (M87)

1. Диана Бугарски, Зорица Кнежевић-Југовић, Ивана Окић Ђорђевић, Андреа Стефановић, **Јелена Јовановић**, Сања Грбавчић, Бранко Бугарски, „Дијететски суплемент на бази биоактивних пептида са антиоксидативном и антитуморском активности“, Завод за интелектуалну својину, Београд, Република Србија, 2015. Патентна пријава П-2015/0361, у поступку признавања

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

У свом досадашњем раду током докторских студија и у оквиру научно-истраживачког рада на пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања Министарства просвете, науке и технолошког развоја, **Јелена Јовановић**, мастер инжењер технологије, је постигла значајне резултате, чиме је показала да поседује склоност, самосталност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Из области истраживања, из које се предлаже тема докторске дисертације, кандидат је први аутор једног рада у истакнутом међународном часопису (M22) и једном међународном часопису (M23), док је коаутор два рада објављена у врхунском међународном часопису (M21) и два у истакнутом међународном часопису (M22). На основу претходно изложеног, Комисија сматра да **Јелена Јовановић**, мастер инжењер технологије, испуњава све потребне услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је развој ензимског поступка производње биолошки активних пептида ултразвучно третираних нативних протеина, њихово изоловање и карактеризација. Као супстрат, захваљујући свом јединственом аминокиселинском саставу и високој нутритивној вредности, изабрано је нативно беланце које чини смешу више од тридесет различитих протеина међу којима је овалбумин најзаступљенији.

Биоактивни пептиди су због своје мале молекулске масе и лаке апсорпције нашли велику примену као имунорегулатори, антихипертензивни и антимикробни пептиди, али и као антиоксиданти. Ови пептиди садрже најчешће 5-16 аминокиселинских остатака и њихова активност се испољава кроз различите механизме. Присуство и правилан положај базних и/или киселих, ароматичних и хидрофобних аминокиселинских остатака у оквиру пептидне секвенце може да доведе до побољшања биолошких активности пептида. Ово је могуће постићи парцијалном и контролисаном ензимском хидролизом нативних протеина при чему се ослобађају специфични ди-, три- и олигопептиди који имају антиоксидативну, антипролиферативну и антихипертензивну активност због чега се добијени хидролизати, полупроизводи, могу користити као нови биоактивни суплементи. Накнадно, из њих се могу применом различитих сепарационих техника изоловати и пречистити пептиди, одредити њихова пептидна секвенца и извршити карактеризација са аспекта различитих биолошких активности. Том приликом могуће је утврдити постојање синергистичког ефеката две или више биолошких активности пептида беланцета што у досадашњим истраживањима није довољно испитано, али и реалације између појединачних пептида и једне од биолошких

активности. Прегледом доступне литературе као главни проблем имплементације биолошки активних пептида намеће се њихова нестабилност и промена хемијске структуре услед термичке обраде, која последично доводи и до промене биолошке активности. Због тога, производња ових нестабилних биоактивних пептида чији је развој уједно и предмет истраживања ове докторске дисертације, захтева коришћење иновативних технологија нпр. ултразвука средњег интензитета, које ће омогућити задржавање биолошке активности без образовања нежељених ефеката. Утицај ултразвука на ензимску хидролизу протеина беланцета, као и на профил и биолошку активност пептида није довољно истражен, али се истиче да технологија ултразвука као брза, поуздана и ефикасна техника може потпомоћи ензимској хидролизаци у ослобађању пептида и на тај начин довести до побољшања биолошких својстава крајњег облика прехранбеног производа.

Основни циљ истраживања ове докторске дисертације представља допринос разумевању између дужине и секвенце пептида добијених из протеина беланцета ензимском хидролизом и њихове биолошке функције. Поред тога, избор одговарајуће егзо- или ендопротеазе, или њихове одговарајуће комбинације, као и оптимизација процесних параметара ензимске хидролизе, у циљу добијања одређених биоактивних пептида у високом приносу такође је предмет ових истраживања. Биолошке активности које ће се разматрати у оквиру тезе су антиоксидативна, антимикробна, антипролиферативна, антихипертензивна и антикоагулативна својства. Поред основног циља дефинисани су и појединачни циљеви истраживања докторске дисертације и подељени на следеће:

- 1) утврђивање начина извођења и оптималних параметара ултразвучног претретмана нативних протеина беланцета са аспекта очувања нутритивних својстава и биолошке активности, али и са аспекта извођења накнадне ензимске хидролизе;
- 2) оптимизација биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета у шаржном реакторском систему са аспекта избора врсте протеолитичких ензима (ендо- и егзо-пептидазе), као и са аспекта избора температуре, рН, концентрације супстрата и ензима, брзине и начина механичког мешања;
- 3) утврђивање процесних параметара биотехнолошког поступка хидролизе са аспекта испитивања кинетике ензимске реакције у шаржном реакторском систему, оптималног начина рада и конструкције биореактора у циљу добијања хидролизата, полупроизвода, побољшаних биолошких својстава у односу на нативне протеине беланцета;
- 4) оптимизација ефикасних сепарационих техника попут ултрафилтрације и гел-филтрационе хроматографије чиме ће се омогућити добијање фракција биоактивних пептида у већим количинама погодних за даљу карактеризацију;
- 5) утврђивање реалације између појединих фракција пептида и једне од биолошких активности;
- 6) оптимизација начина извођења процеса и конфигурације мембранског реакторског система са рецикулацијом и карактеризација добијених фракција пептида са аспекта биолошких активности;
- 7) испитивања функционалних својстава неких емулзија и одабраних система који су од значаја у прехранбеној индустрији након додатка одабраних фракција биоактивних пептида.

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

Abeyrathne, E. D., Lee, H. Y., Ahn, D. U., (2013) Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents--a review. *Poult Sci.* 92(12):3292-3299
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 Technol.* 5:2342-2352

- Chen, C., Chi, Y., Zhao, M., Lv, L. (2012) Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*. 43:457-466
- Danquah, M.K., Agyei, D. (2012) Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology* 1(2):5
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartomel , B., L pez-Fandi o, R. (2004) Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot.* 67(9):1939-1944
- G lseren, I., G zey, D., Bruce, B.D., Weiss, J., (2007) Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrason Sonochem.* 14:173-183
- Ibrahim, H. R., Hoq, M. I., Aoki, T., (2007) Ovotransferrin possesses SOD like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *Int J Biol Macromol.* 41:631-640
- Ibrahim, H. R., Kiyono, T., (2009) Novel anticancer activity of the autocleaved ovotransferrin against human colon and breast cancer cells. *J Agric Food Chem.* 57:11383-11390
- Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y., Aoki, T. (2000). Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523, 196-205
- Lei, B., Majumder, K., Shen, S., Wu, J., (2011) Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. *Food Chem.* 124:808-815
- Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G., Chen, F., (2015) Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chem.* 175: 258-266
- Liu, J.-B., Wang, F., Wang, C., Lin, S., (2012) Optimization of preparation for anticoagulant peptide from egg white powder by Alcalase. *Jilin Daxue Xuebao.* 42(1):250-255
- Martos, G., L pez-Fandi o, R., Molina, E., (2013) Immunoreactivity of hen egg allergens: Influence on in vitro gastrointestinal digestion of the presence of other egg white proteins and of egg yolk. *Food Chem.* 136:775-781
- Mine, Y., Tatsushi, N., Haga, N., (1990) Thermally induced changes in egg white proteins. *J Agric Food Chem.* 38:2122-2125
- Mine, Y., Kovacs-Nolan, J., (2006) New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *World Poultry Sci J.* 62:87-95
- Mine, Y., Ma, F., Lauriau, S., (2004) Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem.* 52:1088-1094
- Moller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., (2008) Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.* 47:171-182
- Moon, S.H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Chang, K. H., Paik, J. Y., Ahn, D. U., Paik, H. D., (2013) Screening for cytotoxic activity of ovotransferrin and its enzyme hydrolysates. *Poult Sci.* 92(2):424-434
- Ozuna, C., Paniagua-Mart nez, I., Casta o-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.* 77:685-696
- Pellegrini, A., (2003) Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr Pharm Des.* 9:1225-1238
- Pellegrini, A., Hulsmeier, A.J., Hunziker, P., Thomas, U., (2004) Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochim Biophys Acta.* 1672:76-85
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.P., Amar, R.B., (2014) Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. *Food Res Int.* 65:329-336
- Sarmadi, B., Ismail, A., (2010) Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides.* 31:1949-1956
- Yi, H. J., Kim, J. Y., Lee, K. H., Lee, H. J., (2003) Anticancer activity of peptide fractions from egg white hydrolysate against mouse lymphoma cells. *Food Sci Biotechnol.* 12(3):224-227
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Wang, F., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., Chen, F., (2011) Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. *J Food Sci.* 76(8):C1149-1155

3. Полазне хипотезе

Предложена истраживања у оквиру ове докторске дисертације полазе од хипотезе да се ензимским поступком хидролизе нативних протеина беланцета могу ослободити и изоловати нови биолошки активни пептиди из добијених хидролизата. Поред тога, како је приликом извођења ензимског поступка хидролизе нативних протеина беланцета доступност пептидних веза у унутрашњости молекула дејству протеолитичких ензима смањена, претпоставља се да ће неки механички претретман, попут контролисаног деловања ултразвуком средњег интензитета у интервалу фреквенци од 16 до 100 kHz, допринети унапређењу ензимског процеса услед промене конформације молекула протеина. Међутим, током извођења претретмана ултразвуком неопходно је задовољити и захтеве који се односе на очување функционалних, реолошких и нутритивних својстава добијених хидролизата и/или фракција пептида из протеина беланцета (овалбумина, овотрансферина, лизозима и овомукоида) и унапређење биолошких активности како би се биоактивни пептиди могли инкорпорирати у одређене водене и двофазне модел системе хране као функционални додаци. Наиме, сувише интензиван третман ултразвуком може да доведе до интермолекулских интеракција након развијања молекула протеина, а услед тога, до њиховог агрегирања, повећања честица и промене физичких и реолошких својстава. Због тога је од изузетне важности испитати корелацију између интензитета и параметара ултразвучног претретмана (време третирања, амплитуда, фреквенца), ензимске хидролизе и биолошких својстава добијених фракција пептида. Наведени захтеви не представљају једноставан задатак и захтевају испитивање великог броја параметара и протеолитичких ензима са ендо- и екзопептидазним механизмом деловања. Прелиминарним истраживањима утврђено је да ултразвучни претретман нативних протеина беланцета значајно утиче на терцијарну и кватернарну структуру протеина, од којих је терцијарна изузетно важна за нутритивна својства протеина, али и да доводи до повећања хидрофобности и броја сулфхидрилних група на површини молекула протеина које су одговорне за већи број дисулфидних мостова и формирање мањих агрегата него под утицајем термичког третмана. Овим чињеницама објашњено је зашто се после третмана ултразвучним таласима добијају протеини веће конформационе покретљивости и доступности протеолитичким ензимима. Стога се као један од научних циљева ове докторске дисертације поставља оптимизација ензимског поступка хидролизе ултразвучно третираних нативних протеина беланцета (смеше свих протеина) и производње хидролизата очуваних нутритивних и унапређених биолошких својстава.

Друга хипотеза је да се применом одговарајућег претретмана и контролисаном и селективном ензимском хидролизом могу добити биоактивни пептиди који истовремено поседују две или више биолошке активности, попут антиоксидативне и антитуморске. Претпоставља се да ће се успоставити нека корелација између наведених својстава и структуре пептида. Исто тако, следећа хипотеза полази од тога да се биоактивни ди-, три- и олигопептиди ослобођени контролисаном ензимском хидролизом претретираних протеина беланцета могу успешно изоловати из смеше ултрафилтрационим и гел-хроматографским техникама на фракције пептида тачно дефинисаних величина полипептидних ланаца, које поседују побољшане биолошке активности у односу на нативне протеине беланцета и полупроизоде, хидролизате. У литератури, на описан начин изоловање и окарактерисан значајан број биолошки активних пептида нативних протеина. Међутим, у литературним радовима, нарочито оним који се односе на изоловање биолошки активних пептида протеина беланцета углавном су коришћени пречишћени модел протеини беланцета: овалбумин, лизозим и овотрансферин, не смеша свих градивних протеина беланцета (нативни протеини беланцета). С обзиром на наведено, као и на чињеницу да последњих година влада велики интерес за природним биолошки активним протеинским суплементима, примарни циљ истраживања ове докторске дисертације односиће се на развој и производњу биолошки

активних пептида протеина беланцета применом иновативне технологије ултразвука средњег интензитета при чему ће се посебна пажња посветити унапређењу биолошке активности као и задржавању одређених својстава током производње без образовања нежељених једињења и споредних производа.

Прегледом доступних литературних истраживања, изоловане фракције пептида овалбумина, овотрансферина и нетретираних нативних протеина беланцета, из хидролизата припремљених пажљивим избором протеолитичких ензима, контролисаним и ограниченим извођењем поступка хидролизе, показују антиоксидативна, антимикробна, имуномодулаторна, антикоагулациона и антихипертензивна својства. Водећи се наведеним, претпоставиће се да ће припремљени хидролазита и/или фракције пептида ултразвучно третираних нативних протеина беланцета поседовати биолошка својства од којих ће у оквиру истраживања ове докторске дисертације испитати следеће активности: антиоксидативна, антимикробна, антихипертензивна, антипролиферативна и антикоагулациона.

Увидом у најразличитија истраживачка решења реакторских система за ензимску хидролизу нативних протеина, истраживања у оквиру ове докторске дисертације базираће се на развоју две принципијално различите конфигурације реактора: шаржни реактор са механичким мешањем и мембрански реактор са рецикулацијом у којем се може омогућити истовремено одвијање хидролизе и сепарације фракција пепида. Претпоставља се да ће се развојем мембранског реакторског система и избором величине ултрафилтрационе мембране у мембранском модулу обезбедити ефикасан систем за рецикулацију ензима у току процеса хидролизе, али и контрола састава хидролизата протеина беланцета, односно степена хидролизе. Додатно, очекује се да ће у области испитивања стабилности система, мембрански реакторски систем омогућити континуалну производњу стабилних и по саставу уједначених хидролизата протеина беланцета очуваних нутритивних својстава, као и фракција пептида тачно дефинисаних биолошких активности.

4. Научне методе истраживања

У поступку реализације научних резултата у оквиру ове докторске дисертације испитивање биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета започеће проучавањем процеса и избора протеолитичких ензимау шаржном реакторском систему са контролисаним механичким мешањем, аутоматском контролом температуре и рН вредности. Претпоставља се да ће избор протеазе бити од круцијалне важности на ослобађање биоактивних ди-, три- и олигопептида. Након избора одговарајућег ензима, у циљу оптимизације процеса разматраће се остали процесни параметри као и геометрија мешалице, брзина и начин мешања. Ток и кинетика ензимске реакције хидролизе протеина беланцета одређиваће се праћењем вредности основног параметра, степена хидролизе, рН-стат методом. Користећи рН-стат методу, степен хидролизе изражен преко количине ослобођених α -амино група биће директно пропорционалан количини утрешене базе за одржавање константне рН вредности реакционе смеше. Ради верификовања остварених степена хидролизе, количина ослобођених α -амино група квантитативно ће се одређивати и спектрофотометријским методама са реагенсом 2,4,6-тринитробензенсулфонском киселином (TNBS) и нинхидринском методом.

Расподела молекулске масе произведених хидролизата протеина беланцета одредиће се извођењем SDS-PAGE електрофорезе у јединици за вертикалну електрофорезу (Hoefer Ruby vertical system; GE Healthcare Life Sciences, USA). На основу добијене расподеле молекулских маса ултрафилтрационо раздвајање хидролизата протеина беланцета извешће се коришћењем ултрафилтрационе једнице (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) и одговарајућих мембрана израђених од регенерисане целулозе различитих величина пора. Након утврђивања биолошки најактивније фракције пептида спровешће се дизајнирање проточног мембранског реакторског система са рецикулацијом и мембранским модулом одговарајуће величине пора (*cut off*), који ће омогућити истовремено одвијање ензимске

реакције и сепарацију биолошки активне фракције. Изоловање и пречишћавање фракције пептида, окарактерисане као биолошки најактивније, извршиће се препаративном гел-филтрационом хроматографијом применом колона за чије пуњење ће се користити комерцијално доступна суспензија Toyopearl HW-40F (метакрилни полимер са уведеним хидроксилним групама који служи за раздвајање биомолекула у опсегу молекулских маса 10-0,1 kDa), али и други матрикси. Исто тако примениће се течно масена (LC-MS) и реверзно-фазна хроматографија високох перформанси (RC-HPLC) применом семи-препаративне и аналитичке C-18 колоне.

Квантитативно, садржај протеина у припремљеним хидролизатима и/или појединачним фракцијама биоактивних пептида одређиваће се стандарном методом по Лорију и/или Бредфорду са албумином из говеђег серума као стандардом. С обзиром да је један од основних циљева израде ове докторске дисертације био изоловање и карактеризација биоактивних пептида из сложене смеше протеина беланцета, од изузетне важности биће тестирање биолошких активности *in vitro* методама. Конкретно, испитиваће се способност деловања хидролизата и изолованих фракција пептида као антиоксидативних, антимикробних, антипролиферативних, антихипертензивних и антикоагулативних агенаса.

Антиоксидативна активност хидролизата и/или фракција пептида испитаће се спектофотометријским мерењем способности хидролизата и/или фракција пептида да:

- редукују 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал (DPPH[•]) и 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) радикалски катјон (ABTS^{•+}),
- инхибирају оксидацију α -дезоксирибозе (тзв. метода неутрализације хидроксилног радикала, [•]ОН) и оксидацију пирогалола (тзв. метода неутрализације супероксид радикала, O₂^{•-})
- хелирају металне јоне (јоне гвожђа),
- инхибирају липидну пероксидацију на моделу пероксидације линолне киселине и
- инхибирају липидну пероксидацију на моделу пероксидације емулзије β -каротен-линолна киселина.

Услед различитости механизма деловања антиоксидативних једињења на реактивне врсте кисеоника, добијене вредности антиоксидативних активности хидролизата, фракција пептида и пречишћених пептида изражене преко степена инхибиције или преко количине еквивалентна стандардних комерцијалних антиоксиданата биће упоређени међусобно, али и са комерцијалним синтетичким антиоксидативним средствима.

Антимикробна активност хидролизата и/или фракција пептида испитаће се стандардним *in vitro* тестовима – методом дифузије на агарној подлози и бујон дилуционом методом одређивања минималне инхибиторне концентрације (на енгл. MIC). Квалитативно и квантитативно, антимикробна активност ће бити изражена дефинисањем ширине зоне инхибиције и MIC вредности. Микробиолошки тестови спровешће се на Грам-позитивним (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), Грам-негативним (*Escherichia coli* ATCC 25922) стандардизованим културама бактерија и квасаца (*Candida albicans* ATCC 24433) који чине део колекције микроорганизама лабораторије за микробиологију ТМФ-а, Универзита у Београду.

Антипролиферативна активност испитиваних хидролизата и/или фракција пептида тестираће се на две туморске ћелијске линије: MCF-7 (хумана ћелијска култура аденокарцинома дојке) и SW480 (хумана ћелијска линија колоректалног аденокарцинома). Испитивања инхибиторног дејства на пролиферацију туморских ћелија MCF-7 и SW480 хидролизата и/или фракција пептида извршиће се колориметријским МТТ тестом, који се заснива на редукцији жуте тетразолијумове соли (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид–МТТ). Додатно, испитивање цитотоксичног ефекта хидролизата и/или фракција пептида обухватиће тестирање утицаја хидролизата и/или фракција пептида на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перидонталног лигамента (PDL-MSC), као типа примарних хуманих ћелија.

Антихипертензивна активност хидролизата и/или фракција пептида и пречишћених пептида одређиваће се *in vitro* спектрофотометријском методом на основу мерења АСЕ-инхибиторне активности коришћењем читача микротитарских плоча (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, UK). Као супстрат користиће се хипурил-хистидил-леуцин и ангиотензин-конвертујући ензим из плућног ткива зеца. Инхибиторна активност ће бити изражавана као концентрација потребна да се инхибира 50% АСЕ активности (IC_{50}). Каптоприл, активни инхибитор ензима који конвертује неактивни ангиотензин I у активни облик, ангиотензин II, који се сматра једним од најјачих ендогених вазоконстриктора, користиће се као стандард за поређење инхибиторне активности.

Антикоагулациона активност хидролизата и изолованих фракција пептида обухватиће мерење времена коагулације рекалцификоване плазме и мерење активiranог парцијалног тромбопластинског времена коришћењем читача микротитарских плоча (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, UK). Јединица антикоагулационе активности том приликом дефинисаће се као она количина протеина потребна да удвостучи време коагулације контроле, плазме.

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да резултати добијени истраживањем у оквиру ове докторске дисертације дају значајан научни допринос изоловању и карактеризацији биоактивних пептида из нативног беланцета, али и на пољу унапређења производње хидролизата (смеше ди-, три- и олигопептида) ензимском хидролизом ултразвучно претретираних нативних протеина беланцета. Такође, очекује се да ће добијени резултати указати на значајне корелације између механизма деловања ултразвучних таласа, механизма деловања протеолитичких ензима и биолошке активност добијених хидролизата и/или биоактивних пептида. Увидом у доступну литературу, значајан број истраживања заснован је на ензимској хидролизи модел протеина беланцета, најчешће овалбумина, овотрансферина и лизозима, као и изоловању и карактеризацији биоактивних пептида. Међутим, нема много радова у којима се као полазни супстрат користи нативно беланце, тј. смеша свих градивних протеина беланцета, претретирано ултразвучним таласима и накнадно подвргнуто дејству протеолитичких ензима. Управо је ово један од научних доприноса докторске дисертације.

Познато је да нативни протеини и/или њихови хидролизати поседују значајан број биолошких активности попут антиоксидативне, антихипертензивне, антикоагулационе, антипролиферативне, и др., али још увек није изолован и идентификован довољан број биоактивних пептида који настају хидролизом одабраних нативних протеина, а поседују истовремено две или више биолошке активности. С тог аспекта, веома је интересно проучити синергизам између антиоксидативне и антипролиферативне активности, као и синергизам између антиоксидативне и антихипертензивне активности хидролизата нативних протеина беланцета и њихових изолованих биоактивних пептида. Проучавање синергистичког ефекта ових биолошких својстава у оквиру докторске дисертације даће значајан научни допринос у разумевању механизма деловања биоактивних пептида, као и проналажењу корелација дужина и секвенци пептида и његових биолошких функција.

Резултати предвиђени планом истраживања дисертације могу да имају и практичан значај и послужиће као основа за формулисање биолошки активних пептида беланцета садржаних у финалној формулацији производа и уједно ће представљати део нових технолошких поступака производње неких прехранбених производа обогаћених фракцијама биоактивних пептида. У оквиру истраживања могу се очекивати неколико основних доприноса заснованих на:

- Утицају технологије ултразвука средњег интензитета на доступност нативних протеина беланцета протеолитичким ензимима и оптимизацији биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета у шаржном реакторском систему;

- Испитивању кинетике ензимске реакције у шаржном реакторском систему у циљу утврђивања оптималног начина рада и конструкције биореактора за производњу хидролизата протеина беланцета;
- Ослобађању биоактивних пептида током поступка ензимске хидролизе претретираних протеина беланцета, што добијене хидролизате издваја као нутритивне и биолошки активне суплементе;
- Ултрафилтрационом фракционисању хидролизата протеина беланцета кроз целулозне мембране различитих величина пора (*cut-off* 30, 10, 3 и 1 kDa) у циљу изоловања биоактивних фракција пептида;
- Карактеризацији биоактивних пептида у ултрафилтрационим фракцијама са аспекта имплементације у крајњим дијететским формулацијама;
- Оптимизацији биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета у мембранском реакторском систему са рецикулацијом и карактеризацији биоактивних пептида у мембранским фракцијама;
- Утврђивању реалације између дужине и секвенце пептида и једне од биолошких активности.

6. План истраживања и структура рада

Предмет истраживања у оквиру докторске дисертације односиће се на оптимизацију ензимског поступка производње, изоловања и карактеризације биолошки активних пептида нативних протеина беланцета. Током оптимизације биотехнолошког поступка, испитаће се и могућност примене савремене ултразвучне технологије средњег интензитета (фреквенце 16 до 100 kHz) као претретмана нативних протеина беланцета и њен утицај на биолошку активност добијених хидролизата и/или појединачних фракција пептида.

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* биће приказан кратак осврт на област истраживања и биће дефинисан предмет и значај истраживања докторске дисертације, актуелност проблематике у свету, допринос и главни циљеви истраживања.

Поглавље *Теоријски део* обухватиће преглед литературе у оквиру досадашњих истраживања на тему ензимског поступка производње биолошки активних пептида из природних протеина, првенствено протеина беланцета, као и истраживања која се односе на изоловање и карактеризацију пептидних фракција унапређених биолошких својстава. Посебан осврт биће дат на теоријски приказ биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета у шаржном реактору са механичким мешањем и мембранском реактору са рецикулацијом, како са аспекта конфигурације реактора тако и са аспекта примењених протеолитичких ензима и њиховог механизма деловања. Такође, у *Теоријском делу* размотриће се проблематика утицаја ултразвучне технологије у комбинацији са биотехнолошким поступком хидролизе на структуромолекула протеина као и могућност њихове примене као једног од могућих решења задржавања биолошке активности без образовања нежељених ефеката (нпр. алергености, промена боје, укуса и др.).

У оквиру поглавља *Експериментални део* описаће се ензимски поступак хидролизе протеина беланцета, нетретираних и претретираних ултразвуком средњег интензитета, као и методе изоловања и карактеризације пептидних фракција као кораци претходно постављених и дефинисаних циљева. Тако ће ово поглавље садржати опис:

- материјала коришћених током истраживања у оквиру израде докторске дисертације,
- опреме коришћене за експериментална истраживања,
- техника и метода неопходних за извођење експеримената,
- претретмана применом технологије ултразвука,
- конфигурације шаржног реактора и извођења емпиријског кинетичког модела,

- поступка изоловања и раздвајања пептидних фракција протеина беланцета ултрафилтрацијом, гел-филтрационом хроматографијом и реверзно-фазном хроматографијом под високим притиском (RC-HPLC),
- метода за одређивање и карактеризацију биолошке активности пептидних фракција (методе за одређивање антиоксидативне, антимикробне, анитипролиферативне, антихипертензивне и антикоагулационе активности),
- поступка и оптимизације ензимске хидролизе протеина беланцета у проточном реактору повезаним са мембранском сепарационом јединицом.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће приказани и дискутовани резултати добијени извођењем експерименталних резултата. Резултати ензимске хидролизе ултразвучно третираних нативних протеина беланцета у шаржном реактору биће детаљно упоређени са аспекта избора протеазе и остварене биолошке активности, а све у циљу селекције оптималних услова извођења биотехнолошког поступка хидролизе и одабира хидролизата за даљи ток истраживања. Хидролизати који покажу највеће укупне биолошке активности биће даље раздвојени на фракције на основу величине, наелектрисања као и степена хидрофобности/хидрофилности пептида. Добијени резултати након изоловања и карактеризације пептидних фракција ће се даље упоређивати у циљу добијања биолошки активне пептидне фракције. На основу ових резултата, развиће се мембрански реакторски систем са рецикулацијом за производњу фракције пептида тачно дефинисаних биолошких својстава. Сви добијени резултати предложеног истраживања ће се поредити са релевантним резултатима доступним у научној литератури и у складу са тиме донеће се релевантни закључци о потенцијалној примени пептидних фракција протеина беланцета.

Конкретно, ово поглавље ће садржати приказ и дискусију следећих експерименталних резултата:

- Оптимизација једноступене и двоступене ензимске хидролизе протеина беланцета у шаржном реакторском систему са механичким мешањем;
- Утицај ултразвучног третмана нативних протеина беланцета на степен хидролизе и антиоксидативну активност током извођења биотехнолошког поступка, као и на крају;
- Ултрафилтрационо фракционисање хидролизата нативних протеина беланцета;
- Утицај ултразвучног третмана на удео и биолошку активност ултрафилтрационих фракција пептида;
- Изоловање и раздвајање ултрафилтрационих фракција пептида и карактеризација фракција са аспекта биолошке активности и аминокиселинског састава;
- Оптимизација ензимске хидролизе протеина беланцета претретираних ултразвуком у мембранском реакторском систему са рецикулацијом са аспекта избора протеолитичких ензима и оперативног режима рада;
- Карактеризација биоактивних пептида у мембранским фракцијама са аспекта биолошке активности;
- Поређење антиоксидативне, анитипролиферативне, антихипертензивне, антимикробне и антикоагулационе активности различито добијених фракција пептида.

У *Закључку* ће сумарно бити представљени резултати добијени на основу приказаних истраживања и указаће се на везу између структуре одређених пептида и њихове биолошке функције као и на корелације између различитих биолошких активности, нарочито антиоксидативне и антитуморске. Поред тога, утврдиће се оптимални технолошки параметри за ензимску производњу одређене фракције биоактивних пептида у мембранском реактору.

Поглавље *Литература* ће садржати литературне наводе цитиране у докторској дисертацији, укључујући и публиковане научне радове проистекле истраживањем у оквиру израде ове докторске дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног, Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације кандидата **Јелене Јовановић** под називом „**Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација**“ научно заснована и предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да прихвати и одобри израду докторске дисертације под наведеним називом. Комисија сматра да је кандидат подобан за реализацију предвиђених циљева истраживања докторске дисертације. Такође, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да Већу научних области техничких наука, Универзитета у Београду упутити захтев 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, 25. 01. 2017. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

Др Радивоје Продановић, ванредни професор
Универзитета у Београду, Хемијски факултет

Др Маја Вукашиновић-Секулић, ванредни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки
факултет