

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/90
(Број захтева)

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

21.04.2017.
(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:

„Функционална и биолошка својства пшеничног глутена модификованог ензимским поступцима (Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten)“.

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

MOHAMED BASHIR ELMALIMADI, мастер инжењер

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао мастер образовање: **Решењем ректора Универзитета у Београду број 06-61302-6053/3-13 од 02.07.2014. године призната је високошколска исправа другог нивоа образовања стечена на Универзитету у Мисурати, Либија, издата 03.06.2014. године.**

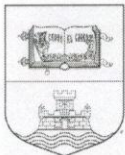
Обавештавамо Вас да је **Наставно-научно веће**, на седници одржаној **20.04.2017. године** размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

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.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Адреса: Студентски трг 1, 11000 Београд, Република Србија
Тел.: 011 3207400; Факс: 011 2638818; E-mail: officebu@rect.bg.ac.rs

Београд, 02.07.2014.
Број: 06-61302-6053/3-13
ВЛМ

На основу члана 104. став 9. Закона о високом образовању ("Службени гласник РС", бр. 76/05, 100/07-аутентично тумачење, 97/08, 44/10, 93/12 и 89/13), члана 15. Правилника о признавању страних високошколских исправа ради наставка образовања ("Гласник Универзитета у Београду" бр. 155/10) и Извештаја и одлуке о могућности признавања стране високошколске исправе ради наставка образовања бр. 06-61301-6053/2-13, од 18.12.2013. године, доносим

РЕШЕЊЕ

ПРИЗНАЈЕ СЕ високошколска исправа другог нивоа високог образовања стечена на **Универзитету у Мисурати, Либија**, која је издата 03.06.2014. године на име **Mohamed Bashir Elmalimadi**.

Овим признавањем **Mohamed Bashir Elmalimadi** стекао је **право на наставак образовања на Универзитету у Београду – Технолошко-металуршки факултет, студијски програм докторских академских студија (Биохемијско инжењерство и биотехнологија)**, уколико испуни услове уписа и рангира се на листи у оквиру одобреног броја за упис студената.

Број признатих бодова у систему ЕСПБ је 240 на првом нивоу високог образовања и 60 на другом нивоу високог образовања, а просечна оцена усклађена са системом високог образовања Републике Србије је 8,27 (осам и 27/100).

Образложење

Универзитету у Београду обратио се **Mohamed Bashir Elmalimadi**, рођен 26.06.1957. године у Мисурати, Либија, захтевом за признавање високошколске исправе другог нивоа високог образовања стечене на Универзитету у Мисурати, Либија, на којем је именовани стекао образовање. Претходни ниво високог образовања кандидат је савладао на истој страниј високошколској установи.

Универзитет у Београду је спровео поступак признавања и вредновања страног студијског програма. Руководилац студијског програма на Универзитету у Београду – Технолошко-металуршки факултет, у складу са чланом 13. Правилника, размотрио је све списе предмета и констатовао да је подносилац захтева стекао довољно знања и вештина и да су испуњени услови за позитивно вредновање страног студијског програма и признавање стране високошколске исправе ради наставка образовања, те је одлучено као у изреци овог решења.

ПОУКА О ПРАВНОМ ЛЕКУ:

Ово решење је коначно у управном поступку, па се против њега може покренути управни спор код Управног суда, у року од 30 дана од дана пријема решења.

РЕКТОР



Проф. др Владимир Бумбаширевић

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 20.04.2017. 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 **Mohamed Bashir Elmalimadi**, мастер инж., под називом: „**Функционална и биолошка својства пшеничног глутена модификованог ензимским поступцима (Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten)**“.

Одобрава се докторанду да докторски рад пише и брани на енглеском језику.

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 Mohamed Bashir Elmalimadi

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.** (2015) Production of Antioxidant Egg White Hydrolysates in a Continuous Stirred Tank Enzyme Reactor Coupled with Membrane Separation Unit, Food and Bioprocess Technology, 8(2), 287-300. ISSN: 1935-5130; IF(2015) 2,574; 27/125 Food Science & Technology.
2. 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, Journal of Food Science, 81 (11), pp. C2664-C2675. ISSN 0022-1147, IF(2015) 1,649; 49/125 Food Science & Technology.
3. Salim, A.A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., **Knežević-Jugović, Z.** (2017) Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods, Bioresource Technology, 228, 193-200. ISSN: 0960-8524; IF(2015) 4,917; 17/161 Biotechnology & Applied Microbiology.
4. **Knežević-Jugovic, Z.D.**, Žuža, M.G., Jakovetić, S.M., Stefanović, A.B., Džunuzović, E.S., Jeremić, K.B., Jovanović, S.M. (2016) An approach for the improved immobilization of penicillin G acylase onto macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) as a potential industrial biocatalyst, Biotechnology Progress, 32(1), 43-53. ISSN: 8756-7938; IF(2015) 2,167; Food Science & Technology 34/125.
5. Jakovetić, S.M., Luković, N.D., Bošković-Vragolović, N.M., Bezbradica, D.I., Picazo-Espinosa, R., **Knežević-Jugović, Z.D.** (2013) Comparative study of batch and fluidized bed bioreactors for lipase-catalyzed ethyl cinnamate synthesis, Industrial and Engineering Chemistry Research, 52 (47), 16689-16697. ISSN: 0888-5885; IF(2013) 2,235; 36/133 Engineering, Chemical.

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

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техникотехнолошких, 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: 20.04.2017

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

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

Predmet: Podobnost teme i kandidata Mohamed Bashir Elmalimadi, master inž., za izradu doktorske disertacije

Odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta br. 35/664 od 29.12.2016. godine, imenovani smo za članove Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata **Mohamed Bashir Elmalimadi, master inž.**, za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme pod nazivom:

„Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima“

„Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten“

Na osnovu materijala priloženog uz Zahtev kandidata, Komisija podnosi sledeći

REFERAT

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografski podaci

Mohamed Bashir Elmalimadi, master, rođen je 26.06.1967. godine u Misrati u Libiji, gde je završio osnovnu i srednju školu. Studije na Univerzitetu Misrata (Science Faculty) završio je školske 1991. godine. Master akademske studije, na studijskom programu Hemija na Univerzitetu u Misrati (Science Faculty) na departmanu za hemiju završio je 2010. godine odbranivši master rad pod nazivom: *“Determination of the concentration of heavy metals in raw milk and baby milk“*. Diplomski rad, kao i master rad, radio je na departmanu za hemiju na gorenavedenom univerzitetu i u oblasti biohemije. Trenutno je angažovan kao asistent na istom departmanu iz predmeta Biohemija I i Biohemija II.

Doktorske studije na Univerzitetu u Beogradu Tehnološko-metalurškog fakulteta upisao je školske 2013/2014. godine na odesku Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Položio je sve ispite predviđene nastavnim planom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,58.

Spisak položenih ispita na doktorskim studijama:

Naziv predmeta	ESPB	Ocena
Hemijska kinetika	5	6
Fizičko-hemijske osnove farmaceutskog inženjerstva	4	10
Odabrana poglavlja matematičke analize	5	9
Odabrana poglavlja biohemije - vitamini	5	10
Biohemijska kinetika	5	10
Metoda konačnih elemenata u inženjerstvu materijala	4	10
Odabrani mikrobiološki procesi u zaštiti	4	10

životne sredine		
Biomasa kao izvor energije	4	10
Sanitarna mikrobiologija	4	10
Industrijska mikrobiologija	5	10
Odabrana poglavlja projektovanja procesa u biohemijskom inženjerstvu	5	10
Završni ispit	30	10
Ukupno	80	9,58

Govori arapski i engleski jezik. Završio je nekoliko Microsoft Windows kurseva.

1.2. Stečeno naučno-istraživačko iskustvo

Od 2011. godine zaposlen je kao asistent iz predmeta Biohemija I i Biohemija II na departmanu za hemiju na Univerzitetu u Misrati, Libija. Kao koautor objavio je jedan rad u međunarodnom časopisu (M23) i sedam saopštenje na međunarodnim skupovima od kojih je pet štampano u celosti (M33), dva rada u izvodu (M34).

Spisak objavljenih naučnih radova i saopštenja

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja - M20

- Rad u međunarodnom časopisu - M23

1. **Elmalimadi, M.B.**, Stefanović, A.B., Šekuljica, N.Ž., Žuža, M.G., Luković, N.D., Jovanović, J.R., Knežević-Jugović, Z.D., The synergistic effect of heat treatment on alcalase-assisted hydrolysis of wheat gluten proteins: Functional and antioxidant properties (2017) *Journal of Food Processing and Preservation*, Article in Press, DOI: 10.1111/jfpp.13207 IF(2015) 0,894, ISSN: 0145-8892.

Zbornici međunarodnih naučnih skupova - M30

- Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini - M33

1. 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

2. **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

3. Knežević-Jugović Z., **Elmalimadi M.**, Stefanović A., Jovanović J, Jakovetić Tanasković S., Bugarski B., Antioxidant Properties of hydrolysates of wheat gluten as influenced by process conditions, Editor: Miladin Gligorić, In *Proceedings of V International Congress "Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 145-153, March 15-17th 2017, CD Proceedings, ISBN 978-99955-81-22-0

4. 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

5. **Elmalimadi B. Mohamed**, Bahout A. Ali (2013): Concentration of Some Trace Elements in Raw Milk and Baby Food. *International Conference on Chemistry, Istanbul, Turkey. ICC 2013, June 20-21 2013, pp 423-427.*

- Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu - M34

1. Hamed B., Bahoot, A., **Elmalimadi M.** (2010) : Levels of Toxic Metals in Samples of Infant Formula. *Accumulation in foods and crops*. 15th ICHMET, Warsaw, Poland, pp 392- 394.

2. Ali A. Bahout, **Mohamed B. Elmalimadi**, (2016) : Cadmium and Lead Residues in Raw Cow's Milk Marketed in Misurata City, Libya . 8th *International Toxicology Symposium in Africa*. 29th to 31st August 2016., Giza , Egypt . Peer Reviewed Conference Proceedings.pp 130-131.

1.3. Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Uzimajući u obzir dosadašnji rad i rezultate ostvarene tokom naučno-istraživačkog rada, Mohamed Bashir Elmalimadi, master, pokazao je interes, sklonost i sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Iz oblasti istraživanja, iz koje se predlaže tema doktorske disertacije, do sada je objavio jedan naučni rad štampan u međunarodnom časopisu, kao i više saopštenja na međunarodnim skupovima. 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 Mohamed Bashir Elmalimadi, master, ispunjava sve potrebne uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

1. Predmet i cilj naučnog istraživanja

Predmet naučnog istraživanja ove doktorske disertacije je enzimska hidroliza pšeničnog glutena u cilju poboljšavanja njegovih funkcionalnih i bioloških svojstava.

Povećanje ljudske populacije na globalnom nivou tokom poslednjih decenija je u mnogome uticalo na potražnju za prehrambenim proizvodima bogatim proteinima i korišćenje biljnih proteina je privuklo značajnu pažnju. U tom smislu pšenični gluten, koji se dobija kao sporedni proizvod tokom procesa izvdajanja pšeničnog skroba u mokrom postupku prerade pšeničnog brašna, može da bude veoma važna sirovina zahvaljujući odgovarajućem aminokiselinskom sastavu i nutritivnim svojstvima, kao i raspoloživosti u velikim količinama.

Gluten je kompleksan protein koji predstavlja rezervne proteine pšenice i sastoji se iz dve frakcije: glijadina, rastvorljivih u alkoholu, i glutenina, nerastvorljivih u alkoholu, ali rastvorljivih u razblaženim kiselinama ili bazama. Glutenini, koji mogu da izgrađuju polimere velike molekulske mase zahvaljujući sposobnosti da obrazuju disulfidne veze i hidrofobne interakcije, doprinose čvrstoći i viskoelastičnim osobinama glutena i testa. Sa druge strane, glijadini su heterogene smeše monomernih proteina čija se molekulska masa kreće u opsegu od 30-80 kDa i doprinose viskozitetu i rastegljivosti testa.

Iako pšenični gluten spada u kvalitetne proteine zbog pogodnog aminokiselinskog sastava i velike biološke vrednosti, njegova šira komercijalna primena kao proteinskih dodataka ishrani je ograničena zbog alergenosti, nedovoljne digestivnosti i male rastvorljivosti, naročito u blizini

izoelektrične tačke (pH 6-7). Rastvorljivost proteina je najbitnije funkcionalno svojstvo budući da protein mora biti rastvoran da bi se uspešno implementirao u različite prehrambene proizvode. Druga funkcionalna svojstava (emulgovanje, geliranje ili penivost) takođe zavise od rastvorljivosti proteina. Poboljšanje rastvorljivosti, emulgujućih i gelirajućih svojstava glutena doprinelo bi povećanju lepeze proizvoda u koje se ovi proteini mogu dodavati kao emulgatori ili gelirajući agensi. Kontrolisanom enzimskom hidrolizom glutena potencijalno se mogu unaprediti funkcionalna i biološka svojstva ovog proteina i valorizovati njegova primena u proizvodnji funkcionalne hrane.

Mala rastvorljivost glutena može se objasniti jakim intermolekulskim interakcijama, kao što su vodonične veze i hidrofobne interakcije, i veličinom molekula. Neka istraživanja, pak, pokazuju da niska rastvorljivost glutena nije zbog slabih voda-protein interakcija, već zbog jakih protein-protein interakcija. Takođe, na nisku rastvorljivost utiču visoke koncentracije prolina i leucina tako da na površini molekula nema puno polarnih i naelektrisanih grupa, što je razumljivo uzimajući u obzir njihov hidrofoban karakter. Način da se ovaj problem prevaziđe jeste izazivanje promene sekundarne i tercijarne strukture proteina mehaničkim i termičkim tretmanima ili njihovo prevođenje u manje peptide hidrolizom. U tom smislu, savremena istraživanja su usmerena na enzimsku hidrolizu pomoću proteolitičkih enzima zbog njihove specifičnosti tako da se može racionalno pristupiti izboru proteaze u skladu sa odabranim mestima napada, odnosno peptidnim vezama koje je potrebno raskinuti, da bi se dobio odgovarajući profil peptida u hidrolizatima. Pored toga, prednosti enzimske hidrolize u ovim postupcima su blagi reakcioni uslovi, smanjeno obrazovanje sporednih proizvoda i dobijanje neobojenih hidrolizata boljeg kvaliteta.

U poređenju sa nativnim proteinima, hidrolizati su značajno svarljiviji, manje su viskozni, lakše se umešavaju, imaju veću rastvorljivost u vodi i smanjen alergeni potencijal. Međutim, ova svojstva u velikoj meri zavise od načina i intenziteta pretretmana, vrste proteaze, reakcionih uslova i stepena hidrolize, odnosno neodgovarajući pretretman i/ili prekomerna hidroliza, ne samo da neće dovesti do unapređenja, već mogu i da prouzrokuju pogoršanje tehnološko-funkcionalnih svojstava. Pored toga, dobijeni hidrolizati često imaju gorak i neprijatan ukus, a mogu da zadrže i alergnost nakon procesa. Zbog toga, u ovoj disertaciji će se posvetiti značajna pažnja optimizaciji tehnoloških i reakcionih parametara pretretmana i enzimskog procesa u cilju dobijanja tehnološko funkcionalnih hidrolizata odgovarajućih nutritivnih i organoleptičkih svojstava.

Sledeći cilj ove disertacije je dobijanje hidrolizata glutena, koji ne samo da imaju odgovarajuća tehnološko funkcionalna svojstva, nego da su i biološki aktivni. Kontrolisanom i parcijalnom hidrolizom proteina mogu se unaprediti njihova fizičko-hemijska svojstva, smanjiti alergnost, ali i osloboditi bioaktivni peptidi koji im dodeljuju dodatna svojstva funkcionalne hrane. Bioaktivnim peptidima se smatraju proteinski fragmenti koji su neaktivni unutar sekvence inicijalnog (roditeljskog) proteina i koji mogu da se oslobode iz prekursora proteina na više načina, pri čemu se u ovom radu razmatra samo hidroliza (proteoliza) proteolitičkim enzimima poreklom iz mikroorganizama, životinja ili biljaka. Ovi peptidi su veličine između 2 i 20 aminokiselina i molekularne mase do 6000 Da, poseduju različite biološke aktivnosti i lakše se intestinalno apsorbuju jer su bolje rastvorni i manjih dimenzija. Molekulska masa i strukturne karakteristike, kao što je hidrofobnost, utiču na glavne transportne puteve kod peptida. Do sada je utvrđeno da se peptidi sa 2-6 aminokiselina brže apsorbuju u poređenju sa proteinima i slobodnim aminokiselinama. Takođe je zabeleženo da dipeptidi, tripeptidi i nešto duži polipeptidni lanci (10-51 aminokiselina) mogu da prođu zid creva netaknuti i ispolje svoju

biološke funkcije na nivou tkiva. Međutim, što je molekulska masa peptida veća, to se smanjuje njegova šansa da prođe intestinalne barijere.

Mnoge studije su sprovedene kako bi se utvrdilo antioksidativno dejstvo hidrolizata ili bioaktivnih peptida iz različitih prirodnih biljnih ili životinjskih proteina. Tačan mehanizam njihove antioksidativne aktivnosti još uvek nije u potpunosti objašnjen, ali mnogobrojne studije pokazuju da su oni inhibitori lipidne peroksidacije, sakupljači slobodnih radikala i helatori prelaznih metala. Generalno njihova antioksidativna aktivnost se povezuje sa njihovim sastavom, strukturom i hidrofobnošću. Npr. aminokiseline Tyr, Trp, Met, Lys, Cys, i His pokazuju antioksidativnu aktivnost, budući da imaju aromatični ostatak koji može da donira protone radikalima, dok je antioksidativna aktivnost peptida koji sadrži His vezana za doniranje vodonika, inhibiciju lipid-peroksidnog radikala i/ili njegovu sposobnost heliranja metala. Sa druge strane, SH grupa cisteina ima nezavisno ključnu antioksidativnu aktivnost usled direktne interakcije sa radikalima. Međutim, pored aminokislinskog sastava, veliki uticaj na antioksidativnu aktivnost ima i njihova sekvenca. Pokazano je na istraživanju koje je obuhvatalo sintezu različitih varijacija antioksidativnog peptida Leu-Leu-Pro-His-His, koji nastaje hidrolizom konglicina, proteina iz soje, da aktivnost ovog peptida najviše zavisi od His-His segmenta i da njegova aktivnost opada uklanjanjem histidinskog ostatka na C-terminalnom kraju. U istom istraživanju je zaključeno da Pro-His-His sekvenca pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost među svim testiranim varijacijama ovog peptida. U drugom istraživanju je isto tako utvrđeno da svaka promena u redosledu i sastavu tripeptida rezultuje drugačijom antioksidativnom aktivnošću. Takođe, pokazalo se da određene aminokiseline pokazuju veću antioksidativnu aktivnost kada se nalaze u obliku dipeptida. Suprotno ovim nalazima, pokazalo se i da peptidna veza može da redukuje antioksidativnu aktivnost aminokiselina koje je grade. Zaključak je da se peptidna formacija može dvojako ponašati, može rezultovati i sinergetskim i antagonističkim efektom u slučaju antioksidativne aktivnosti. Na kraju, utvrđeno je da je antioksidativna aktivnost hidrolizata povezana sa koncentracijom i molekulskom masom hidrolizata. Tako, antioksidativna aktivnost peptida molekulske mase 500 – 1500 Da, koji su dobijeni hidrolizom glutena iz kukuruza, je bila veća nego aktivnost peptida molekulske mase ispod 500 Da i preko 1500 Da. Kod peptida dobijenih iz konglicina, trend je bio suprotan, što ukazuje na potrebu za pojedinačnim ispitivanjima u slučaju svakog proteinskog izvora.

U toku izvođenja enzimske reakcije na antioksidativnu i biološku aktivnost, uopšte, mogu uticati uslovi rada prilikom izvođenja hidrolize proteina, tip proteaze, stepen hidrolize, struktura peptida i njihova koncentracija, način izolovanja iz hidrolizata. Nedavna istraživanja su pokazala da pšenični gluten i njegovi hidrolizati imaju veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa proteinima kukuruza ili graška, što su doveli u vezu sa značajno većim sadržajem disulfidnih veza (45,37 nmol/mg) i ukupnog cisteina (93,88 nmol/mg) u poređenju sa proteinima kukuruza ili graška. Uprkos industrijskom značaju pšeničnog glutena kao multifunkcionalnog ingredijenta, veoma malo se zna o proizvodnji antioksidativnih peptida iz ovog proteina kao i uticaju operativnih uslova na stepen hidrolize i antioksidativnu aktivnost hidrolizata.

Enzimska hidroliza proteina u industrijskim uslovima se najčešće odvija u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem, pri čemu dolazi do nekoliko problema poput inhibicije enzima proizvodima reakcije, inaktivacije enzima smicajnim silama i problema zaustavljanja reakcije. Naročito je hidroliza glutena u tim uslovima otežana jer je gluten nerastvoran i pri većim koncentracijama dobijaju se viskozni disperzioni sistemi, što prouzrokuje dodatne mehaničke probleme pri pumpanju i mešanju ovih sistema i negativno utiče na prenos mase i toplote. Adekvatnim mešanjem treba da se spreči i taloženje težih čestica na dno reaktora, što vodi ka

smanjenju aktivne zapremine, odnosno zapremine u kojoj se odigrava reakcija. Razmatrajući generalno hidrolizu proteina, u istraživanjima se obično koristi orbitalno mešanje u šejkerima ili uz pomoć magnetne mešalice, dok veoma mali broj radova u literaturi razmatra uticaj geometrije mešalice, brzine i načina mešanja na hidrolizu proteina. O uticaju mešanja na hidrolizu pšeničnog glutena nema podataka, tako da će se jedan deo istraživanja u ovoj doktorskoj tezi odnositi na ovu problematiku.

Osnovni cilj ove disertacije je da se doprinese razumevanju uticaja termičkog pretretmana i procesnih parametara pri izvođenju enzimske hidrolize pšeničnog glutena na tehnološko-funkcionalna i biološka svojstva dobijenih hidrolizata. Stoga se ciljevi istraživanja obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom mogu podeliti u nekoliko celina:

1. Utvrđivanje optimalnih procesnih parametara i načina izvođenja toplotnog pretretmana glutena sa aspekta strukture i funkcionalnih svojstava tretiranih proteina;
2. Ispitivanje uticaja toplotnog pretretmana na denaturaciju proteina glutena praćenjem promene strukture proteina, stepena hidrofobnosti površine, sadržaja ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa, i veličine agregiranih molekula proteina nakon pretretmana;
3. Utvrđivanje optimalnih procesnih parametara i načina izvođenja toplotnog pretretmana glutena sa aspekta izvođenja naknadne enzimske hidrolize i biološke aktivnosti hidrolizata;
4. Optimizacija procesa enzimske hidrolize u pogledu izbora jedne ili kombinacije više proteaza i stepena hidrolize sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava hidrolizata (rastvorljivosti pri različitim pH vrednostima, penivosti, stabilnosti pene, emulgujućih i gelirajućih svojstava, sposobnosti vezivanja vode i ulja i drugo);
5. Optimizacija procesnih parametara enzimske hidrolize u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem kao što su temperatura, pH, odnos enzim/supstrat, početna koncentracija glutena u pogledu stepena hidrolize i tehnološko-funkcionalnih svojstava hidrolizata;
6. Utvrđivanje uticaja geometrije mešalice i brzine mešanja na brzinu enzimske reakcije i stepen hidrolize;
7. Odabir odgovarajuće proteaze ili odgovarajuće kombinacije dve ili više proteaza za dobijanje hidrolizata proteina glutena sa antioksidativnim aktivnostima;
8. Optimizacija efikasnih separacionih tehnika poput membranskih separacionih tehnika, preparativne gel-filtracione hromatografije i jonoizmenjivačke hromatografije, čime će se omogućiti dobijanje frakcija bioaktivnih peptida u većim količinama pogodnih za dalju karakterizaciju;
9. Utrđivanje realacije između strukture i sekvence peptida izolovanih iz hidrolizata proteina glutena i antioksidativne aktivnosti;
10. Razvoj membranskog reaktorskog sistema koji bi se sastojao iz šaržnog reaktora sa mehaničkim mešanjem i membranskog modula sa membranom tačno određenih performansi za dobijanje frakcije peptida sa najvećom antioksidativnom aktivnošću i u velikom prinosu.

Relevantni bibliografski izvori povezani sa predmetom istraživanja ove doktorske disertacije, koji ujedno predstavljaju polaznu osnovu za dalji tok istraživanja su:

1. Cian RE, Vioque J, Drago SR. 2015. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. Food Res. Int. 69:216–223. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.036

2. Day L, Augustin MA, Batey IL, Wrigley CW. 2006. Wheat gluten uses and industry needs. *Trends Food Sci. Technol.* 17:82-90. doi:10.1016/j.tifs.2005.10.003
3. Deng L, Wang Z, Yang S, Song J, Que F, Zhang H, Feng F. 2016. Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *Aspergillus usamii*. *PLOS ONE* 11(7):e0160101. doi:10.1371/journal.pone.0160101
4. Drago SR, González, RJ. 2001. Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1:69-273. doi:10.1016/S1466-8564(00)00034-5
5. Ellouzi SZ, Driss D, Maktouf S, Blibech M, Affes M, Kamoun H, Chaabouni SE, Ghorbel RE. 2014. Suitability of enzymatic hydrolyzates of extracted gluten from fresh pasta by-product used as bread improvers. *J Cereal Sci.* 60(2):339–345. doi:10.1016/j.jcs.2014.05.014
6. Gottardi D, Khoon Hong P, Ndagijimana M, Betti M. 2014. Conjugation of gluten hydrolysates with glucosamine at mild temperatures enhances antioxidant and antimicrobial properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 57(1):181–187. doi:10.1016/j.lwt.2014.01.013
7. Jin D-X, Liu X-L, Zheng X-Q, Wang X-J, He J-F. 2016. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chem* 204:427–436. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.119
8. Koo SH, Bae IY, Lee S, Lee D-H, Hur B-S, Lee HG. 2014. Evaluation of wheat gluten hydrolysates as taste-active compounds with antioxidant activity. *J Food Sci. Technol.* 51(3):535-542. doi:10.1007/s13197-011-0515-9
9. Nouri L, Legrand J, Popineau Y, Belleville P. 1997. Enzymatic hydrolysis of wheat proteins part I. Enzymatic kinetics and study of limited hydrolysis in a batch stirred reactor. *Chemical Engineering Journal* 65(3):187-194. doi:10.1016/S1385-8947(97)00002-8
10. Peterson SC, Jong L. 2011. Effect of shearing on the reinforcement properties of vital wheat gluten. *J Elastom. Plast.* 43:207–220. doi:10.1177/0095244310397740
11. Song Y, Zheng Q. 2009. Influence of sodium and calcium ions on rheological behaviour of wheat glutenins extracted in alkaline ethanol solution. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44(9):1743-1747. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.01990.x
12. Wang L, Ding L, Yu Z, Zhang T, Ma S, Liu J. 2016. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells. *Food Res. Int.* 90:33–41. doi:10.1016/j.foodres.2016.10.023
13. Žilić S, Akıllıoğlu G, Serpen A, Barać M, Gökmen V. 2012. Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins. *Food Res. Int.* 49:1–6. doi:10.1016/j.foodres.2012.06.031
14. Elmalimadi, M.B., Stefanović, A.B., Šekuljica, N.Ž., Žuža, M.G., Luković, N.D., Jovanović, J.R., Knežević-Jugović, Z.D. The synergistic effect of heat treatment on alcalase-assisted hydrolysis of wheat gluten proteins: Functional and antioxidant properties (2017) *Journal of Food Processing and Preservation, Article in Press*. DOI: 10.1111/jfpp.13207

2. Polazne hipoteze

Predložena istraživanja u okviru ove doktorske disertacije polaze od hipoteze da se kontrolisanom i parcijalnom enzimskom hidrolizom nativnih proteina pšeničnog glutena mogu pooljšati tehnološko-funkcionalna svojstva glutena poput rastvorljivosti, penivosti, emulgirajućih i gelirajućih svojstava. U prilog ovoj hipotezi idu neka istraživanja vezana za hidrolizu glutena fungálnom proteazom iz *Aspergillus oryzae* koja su pokazala da se rastvorljivost povećava sa

stepenom hidrolize u čitavom ispitivanom opsegu, dok se penivost povećava do nekog kritičnog stepena hidrolize od oko 14%, kada naglo opada. Zaključak je da protein mora da zadrži neki minimum strukture da bi ispoljavao dobar kapacitet i stabilnost penjenja. U drugoj studiji enzimske hidrolize pšeničnog glutena bakterijskom proteazom, utvrđeno je da ovaj kritični stepen hidrolize treba da bude još manji, ispod 5%, da bi hidrolizat imao odgovarajuću penivost i emulgujuća svojstva. Međutim, postignuta tehnološko-funkcionalna svojstva hidrolizata glutena još uvek nisu dovoljno unapređena za komercijalnu primenu. Isto tako, usled dejstva proteaza mogu se poboljšati senzorna svojstva proteina, ali treba voditi računa o tome da prekomorna hidroliza dovodi do oslobađanja gorkih peptida, čime se narušava ukus proizvoda. U ovom radu se pretpostavlja da će se primenom odgovarajuće proteaze ili kombinacijom dve i više proteaza, kao i pažljivom optimizacijom stepena hidrolize i ostalih procesnih parametara dobiti hidrolizat sa značajno poboljšanim sledećim svojstvima: organoleptičkim osobinama, rastvorljivosti pri različitim pH vrednostima, emulgujućim svojstvima, penivosti i gelirajućim svojstvima.

Potrebno je istaći da dobijanje hidrolizata koji će istovremeno zadovoljiti više zahteva kao, na primer, zadržati odgovarajuća organoleptička i nutritivna svojstva uz poboljšana tehnološko funkcionalna svojstva, nije jednostavan zadatak i zahteva primenu odgovarajućeg pretretmana, najčešće termičkog, kao i više od jedne proteaze u jednostepenom ili višestepenom enzimskom procesu. Stoga je najefikasnije gluten fizičko-hemijskim tretmanom „pripremiti“ za enzimsku hidrolizu, odnosno denaturisati, tako da se peptidne veze u unutrašnjosti molekula izlože dejstvu proteaza. Ovaj pretretman može značajno uticati na specifičnost proteaza jer neke veze unutar molekula mogu ostati nedostupne dejstvu enzima, a time i na funkcionalna i na biološka svojstva hidrolizata. Pored toga, primena pretretmana može dovesti do usložnjavanja i poskupljivanja celokupnog procesa. Zbog toga, treba da bude pažljivo optimizovan kako sa aspekta funkcionalnih i bioloških svojstava proteina, tako i sa aspekta efekta na samu enzimsku hidrolizu i ukupne performanse procesa.

Sledeća hipoteza od koje se polazi u ovoj disertaciji je da će se pravilnim izborom načina mešanja i geometrije mešalice, kao i podešavanjem brzine mešanja, unaprediti prenos mase i toplote u ovom disperznom sistemu i omogućiti rad sa većim početnim koncentracijama glutena. Naime, u nekoliko istraživanja koja se bave hidrolizom pšeničnog glutena, početne koncentracije proteina su svega 1-10 %. Rad sa koncentrovanijim supstratima ima velikih prednosti poput smanjenih potreba za koncentrovanjem i izdvajanjem proizvoda i mogućnost postizanja većih prostorno-vremenskih prinosa reaktora.

Jedna od hipoteza je da će primenom odgovarajućeg pretretmana i kontrolisanom i selektivnom enzimskom hidrolizom dobiti bioaktivni peptidi koji poseduju antioksidativnu aktivnost. Pretpostavlja se da će se uspostaviti neka korelacija između strukture, molekulske mase i sekvence peptida i antioksidativne aktivnosti. Isto tako, sledeća hipoteza polazi od toga da se bioaktivni di-, tri- i oligopeptidi oslobođeni kontrolisanom enzimskom hidrolizom pretretiranog glutena mogu uspešno izolovati iz smeše membranskim separacionim tehnikama i hromatografskim tehnikama na frakcije peptida tačno definisanih veličina polipeptidnih lanaca, koje poseduju poboljšane biološke aktivnosti u odnosu na nativni gluten i hidrolizate. U literaturi, na opisan način izolovan je i okarakterisan značajan broj biološki aktivnih peptida iz nekih prirodnih proteina. Međutim, malo se radova odnosi na pšenični gluten. U jednom od istraživanja, peptidi koji imaju potencijalnu antioksidativnu aktivnost su razdvojeni od hidrolizata pšeničnog glutena primenom jonoizmenjivačke i gel filtracione hromatografije. Peptidi iz najaktivnijih frakcija izdvojeni na Sephadex G-25 koloni su dalje razdvajani koristeći tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC). Pokazano je da su aminokiselinske sekvence

ovih peptida bile Leu-Gln-Pro-Gly-Gln-Gly-Gln-Gln-Gly i Ala-Gln-Ile-Pro-Gln-Gln. Oko 30% ovih ostataka aminokiselina su hidrofobni i u velikoj meri doprinose sposobnosti ostataka da formiraju agregate proteina hidrofobnim interakcijama i da vezuju nepolarne supstance. Pretpostavka u ovoj disertaciji je da će se pravilnim odabirom uslova termičkog pretretmana glutena, izborom jedne ili kombinacijom dve i više proteaza različitog porekla, kao i podešavanjem stepena hidrolize iz glutena izdvojiti nove sekvence bioaktivnih peptida čija će antioksidativna aktivnost biti potvrđena različitim metodama.

Još jedna od hipoteza je da će na osnovu definisanih tehnoloških i procesnih parametara biti moguće dizajnirati membranski sistem koji se sastoji od šaržnog reaktora sa odgovarajućim načinom mešanja i membranskog modula sa membranom definisanih performansi za proizvodnju po sastavu ujednačenih hidrolizata glutena, kao i frakcije peptida tačno definisane antioksidativne aktivnosti.

4. Naučne metode istraživanja

Enzimska reakcija hidrolize pšeničnog glutena će se izvoditi u šaržnom reaktoru cilindričnog oblika sa automatskom kontrolom temperature $\pm 0,5$ °C i pH vrednosti $\pm 0,1$ uz kontrolisano mehaničko 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 spektrofotometrijskim metodama i to sa 2,4,6-trinitrobenzensulfonskom kiselinom (TNBS) i ninhidrinskom metodom. U radu će se ispitati uticaj različitih tipova mešalica i to propellerske mešalice, mešalice sa zakošenim lopaticama, helikoidalne mešalice i sidraste mešalice kao i brzine mešanja na brzinu reakcije i stepen hidrolize.

Promene u strukturi glutena nakon termičkog pretretmana i hidrolize pratiće se pomoću Ramanove i FTIR spektroskopije. 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} .

Hidrofobnost pretretiranih, hidrolizovanih i intaktnih proteina glutena će se određivati spektrofotometrijski pomoću sprektrofluorimetra (Horiba FluoroMax[®] 4) prema originalnoj ili modifikovanoj metodi iz literature.

Od tehnološko funkcionalnih svojstava razmatraće se: penivost, emulgaciona svojstva, rastvorljivost pri različitim pH i gelirajuća svojstva. Rastvorljivost proteina određivaće se spektrofotometrijski na sledeći način. 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. Posle toga, analiziraće se sadržaj proteina u supernatantu i početnom uzorku standardnom metodom po Loriju i na osnovu njihovih odnosa odrediće se rastvorljivost proteina. Kapacitet i stabilnost pene termički pretretiranog glutena, hidrolizata i nativnog glutena 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

spektrofotometrijskom metodom i biće izražena kroz indekse emulgacione aktivnosti i stabilnosti. Sadržaj ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa, digestivnost hidrolizata meriće se spektrofotometrijski prema modifikovanim metodama iz literature.

Gorčina hidrolizata koji su prethodno osušeni sprej sušenjem određivaće se na osnovu subjektivnog osećaja tri individue pri koncentraciji peptida 30 mg/cm^3 i izražavati u jedinicama koncentracije rastvora kofeina iste gorčine. Pre sušenja izvršiće se uklanjanje soli iz hidrolizata nakon završene hidrolize dijalizom pomoću standardnih creva za dijalizu naspram destilovane vode.

Raspodela molekulske mase proizvednih hidrolizata glutena odrediće se izvođenjem SDS-PAGE elektroforeze u jedinici za vertikalnu elektroforezu (Hoefer Ruby vertical system; GE Healthcare Life Sciences, USA) kao i preparativne gel-filtracione hromatografije. Izolovanje i prečišćavanje frakcije peptida izvršiće se korišćenjem ultrafiltracione jedinice (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) i odgovarajućih membrana izrađenih od regenerisane celuloze različitih veličina pora, preparativnom gel-filtracionom i jonoizmenjivačkom hromatografijom primenom kolona za čije punjenje će se koristiti komercijalno dostupna suspenzija Toyopearl HW-40F (metakrilni polimer sa uvedenim hidroksilnim grupama koji služi za razdvajanje biomolekula u opsegu molekulskih masa 10-0,1 kDa), ali i drugi matriksi. Isto tako primenjivaće se i reverzno-fazna hromatografija visokoh performansi (RC-HPLC) primenom semi-preparativne i analitičke C-18 kolone. Na osnovu karakterisanja frakcije peptida sa velikom antioksidativnom aktivnosti, sprovedeće se dizajniranje protočnog membranskog reaktorskog sistema sa šaržnim reaktorom i membranskim modulom odgovorajuće veličine pora i/ili stepena hidrofobnosti, koji će omogućiti kontinualnu proizvodnju frakcije peptida tačno definisanih svojstava.

Antioksidativna aktivnost hidrolizata i/ili frakcija peptida ispitaće se spektrofotometrijskim merenjem sposobnosti hidrolizata i/ili frakcija peptida da:

- redukuju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•]) i 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikalski katjon (ABTS^{•+}),
- inhibiraju oksidaciju pirogalola (tzv. metoda neutralizacije superoksid radikala, O₂^{•-}),
- heliraju metalne jone (jone gvožđa),
- inhibiraju lipidnu peroksidaciju na modelu peroksidacije linolne kiseline i
- inhibiraju lipidnu peroksidaciju na modelu peroksidacije emulzije β-karoten–linolna kiselina.

Usled različitosti mehanizama delovanja antioksidativnih jedinjenja na reaktivne vrste kiseonika, dobijene vrednosti antioksidativnih aktivnosti hidrolizata, frakcija peptida i prečišćenih peptida izražene preko stepena inhibicije ili preko količine ekvivalenta standardnih komercijalnih antioksidanata biće upoređeni međusobno, ali i sa komercijalnim sintetičkim antioksidativnim sredstvima.

5. Očekivani naučni doprinos

Očekuje se da rezultati dobijeni istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije daju naučni doprinos izolovanju i karakterizaciji bioaktivnih peptida iz pšeničnog glutena, ali i u oblasti unapređenja tehnološko-funkcionalnih svojstava glutena i/ili njegovih hidrolizata. Iako je u toku različitih istraživanja izolovan i identifikovan veliki broj novih peptida tokom proteolize različitih prirodnih proteina i njihovih frakcija, naročito kazeina, konglicinina i glicinina soje, ovalbumina,

lizozima, pa i glutena iz kukuruza, malo podataka se odnosi na antioksidativne peptide dobijene iz pšeničnog glutena i/ili njegovih frakcija, glutenina i glijadina. Jedan od naučnih doprinosa ove teze je i u otkrivanju novih sekvenci bioaktivnih peptida kao i razvoju postupaka za njihovu izolaciju i prečišćavanje.

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

- Nova saznanja o mogućnosti unapređenja tehnološko-funkcionalnih svojstava glutena termičkim tretiranjem i kontrolisanom i parcijalnom enzimskom hidrolizom;
- Utvrđivanje uticaja parametara termičkog pretretmana, naročito temperature i dužine tretiranja, na strukturu, stepen hidrofobnosti i međusobne interakcije molekula proteina glutena kao i na njihovu dostupnost hidrolizi različitim proteazama;
- Utvrđivanje uticaja parametara termičkog pretretmana, naročito temperature i dužine tretiranja, na tehnološko-funkcionalna svojstva glutena (rastvorljivost, penivost, emulgujuća i gelirajuća svojstva);
- Uspostavljanje korelacije između strukture, veličine (potencijalne agregacije molekula), stepena hidrofobnosti pretretiranih molekula proteina i njihovih tehnološko-funkcionalnih svojstava;
- Optimizacija procesnih parametara pri enzimskoj hidrolizi glutena, stepena hidrolize kao i izbor jedne ili kombinacije više proteaza u pogledu dobijanja hidrolizata sa poboljšanim tehnološko-funkcionalnim svojstvima; uspostavljanje korelacije između stepena hidrolize i funkcionalnosti hidrolizata;
- Utvrđivanje novih sekvenci peptida sa antioksidativnim aktivnostima iz pšeničnog glutena kao i doprinos razumevanju mehanizma delovanja odabranih proteaza na gluten i tumačenje njihove specifičnosti;
- Nova saznanja o uticaju mehaničkog mešanja na enzimsku hidrolizu glutena u šaržnom reaktoru koja mogu ukazati na mogućnosti poboljšanja njegove konstrukcije sa aspekta izbora tipa mešalice i načina mešanja;
- Utvrđivanje mehanizma antioksidativne aktivnosti izolovanih frakcija bioaktivnih peptida iz pšeničnog glutena;
- Razvoj membranskog sistema koji se sastoji iz šaržnog reaktora i membranskog modula koji će omogućiti kontinualno dobijanje bioaktivne frakcije peptida tačno definisanih svojstava.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Predložena disertacija biće sačinjena iz nekoliko celina. Prva celina obuhvatiće ispitivanje uticaja osnovnih parametara termičkog pretretmana kao što su temperatura i dužina trajanja pretretmana na stepen denaturacije proteina glutena. Pratiće se molekulske promene sekundarne i tercijarne strukture, stepena hidrofobnosti površine, sadržaja ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa, ali i promene izazvane intermolekulskim interakcijama poput agregacije molekula. Posebna pažnja biće posvećena određivanju funkcionalnih svojstava u cilju pronalaženja odgovarajuće korelacije između stepena strukturnih promena i funkcionalnosti proteina glutena.

U drugom delu ispitaće se mogućnost unapređenja tehnološko-funkcionalnih svojstava glutena kontrolisanom enzimskom hidrolizom. Ispitaće se uticaj mešanja na brzinu enzimske reakcije. Nakon odabira odgovarajućeg režima mešanja i tipa mešalice, ispitaće se uticaj vrste proteaze ili kombinacije više proteaza na stepen hidrolize i tehnološko-funkcionalna svojstva. Dalja optimizacija procesnih parametara pri enzimskoj hidrolizi glutena sa odabranom proteazom poput temperature, pH, početne koncentracije glutena i odnosa enzim/supstrat vršiće se primenom statističkih metoda i eksperimentalnih planova. U tom cilju primeniće se Box-

Behnken-ov eksperimentalni plan, a kao odgovori sistema posmatrače se stepen hidrolize, rastvorljivost pri pH 6,5, kapacitet i stabilnost penjenja kao i indeksi emulgacione aktivnosti i stabilnosti.

Treća celina biće posvećena optimizaciji procesnih parametara i načinima izvođenja enzimske hidrolize sa aspekta dobijanja frakcija di-, tri- i oligopeptida sa antioksidativnim svojstvima.

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 definisaće 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 različitih pretretmana, prvenstveno pšeničnog glutena, kao i istraživanja koja se odnose na strukturne promene izazvane primenom određenog pretretmana i enzimske hidrolize proteina kao načina poboljšanja funkcionalnih i bioloških svojstava proteina. Takođe, poseban osvrt će biti dat na teorijski prikaz poznatih mehanizama delovanja, svojstva i klasifikaciju proteaza koje mogu da katalizuju reakciju hidrolize pšeničnog glutena. Detaljno će biti dat pregled poznatih sekvenci bioaktivnih peptida koji su izolovani iz različitih prirodnih proteina ili njihovih frakcija i dosadašnjih saznanja o vezi odgovarajuće strukture i sekvence peptida sa nekom od antioksidativnih aktivnosti.

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

- Materijali korišćeni u izradi doktorske disertacije;
- Opis šaržnog reaktora, mešalica i opreme korišćene za eksperimentalna istraživanja;
- Prikaz tehnika i metoda za izvođenje eksperimenta;
- Metode za određivanje strukture proteina, stepena hidrofobnosti, veličine i karakterizacije čestica (molekula proteina različitog stepena agregacije);
- Detaljan prikaz metoda za određivanje funkcionalnih svojstava proteina;
- Detaljan prikaz metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti hidrolizata i pojedinačnih frakcija peptida;
- Membranske separacione tehnike za razdvajanje peptida;
- Semipreparativne hromatografske tehnike za razdvajanje peptida;
- Karakterisanje peptida primenom tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC/MS).

U poglavlju *Rezultati i diskusija* biće prikazani i diskutovani dobijeni rezultati. Detaljno će biti upoređeni rezultati dobijeni primenom termičkog pretretmana. Dobijeni rezultati sa različitim proteazama ili kombinacijom više proteaza koje deluju po endo- ili egzo-mehanizmu će se dalje upoređivati, a sve u cilju selekcije optimalnih uslova koji će najviše uticati na brzinu reakcije hidrolize i funkcionalna svojstva hidrolizata. Dobijeni rezultati nakon izolovanja i karakterizacije peptidnih frakcija će se dalje upoređivati u cilju dobijanja biološki aktivne peptidne frakcije. Na osnovu ovih rezultata, razvije se membranski reaktorski sistem za proizvodnju frakcije peptida tačno definisanih bioloških svojstava.

Ovo poglavljje sadržiće prikaz i diskusiju sledećih eksperimenata:

- Uticaj termičkog pretretmana na strukturu i tehnološko-funkcionalna svojstva glutena;
- Optimizacija jednostepene i dvostepene enzimske hidrolize pšeničnog glutena u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem sa aspekta izbora proteolitičkog enzima i mehaničkog mešanja;

- Optimizacija enzimske hidrolize pšeničnog glutena u šaržnom reaktoru u pogledu rastvorljivosti, penivosti, emulgacionih i gelirajućih svojstava;
- Korelacija između stepena hidrolize i tehnološko-funkcionalnih svojstava hidrolizata glutena;
- Uticaj specifičnosti proteaze i stepena hidrolize na antioksidativna svojstva hidrolizata;
- Optimizacija procesnih parametara pri enzimskoj hidrolizi glutena u pogledu antioksidativne aktivnosti hidrolizata;
- Izolovanje i razdvajanje peptide na frakcije primenom membranskih separacionih i hromatografskih tehnika;
- Antioksidativna aktivnost i karakterisanje izdvojenih frakcija peptida;
- Enzimska hidroliza pšeničnog glutena u membranskom sistemu za dobijanje frakcije peptida definisanih 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 Mohamed Bashir Elmalimadi pod nazivom „**Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima**“ (**Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten**) 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 dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Kandidat piše i brani doktorsku disertaciju na engleskom jeziku. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova.

U Beogradu 10.04.2017.

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, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor
Univerziteta u Beogradu, Hemijski fakultet