

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета" број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата

АНДРЕЕ (Боривоје) СТЕФАНОВИЋ, мастер инж. технологије
(име, име једног од родитеља и презиме)

КАНДИДАТ: **АНДРЕА (Боривоје) СТЕФАНОВИЋ, мастер инж. технологије,**
пријавио је докторску дисертацију под називом:

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

Из научне области: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Универзитет је дана **13.06.2016.** године, својим актом **02 број: 61206-2705/2-16** дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

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

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

АНДРЕЕ (Боривоје) СТЕФАНОВИЋ, мастер инж. технологије
(име, име једног од родитеља и презиме)

образована је на седници одржаној **20.04.2017.** године Одлуком Факултета под бр. **35/95,** у саставу:

Име и презиме	Звање	Научна област
1. Др Зорица Кнежевић-Југовић	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
2. Др Бранко Бугарски	Редовни професор	Хемијско инжењерство
3. Др Марица Ракин	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
4. Др Мирјана Антов	Редовни професор	Биотехнологија
5. Др Сања Грбавчић	Научни сарадник	Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **06.07.2017.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаковић

На основу чл. 30. став 3. Закона о високом образовању, чл. 40. Статута ТМФ и чл. 39. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 06.07.2017. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Марица Ракин, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Мирјана Антов, редовни професор Универзитета у Новом Саду, Технолошки факултет, др Сања Грбавчић, научни сарадник Универзитета у Београду, Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“** коју је поднела **Андреа Стефановић**, мастер инжењер технологије и упућује се на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације Андреа Стефановић, под називом **„Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“** Одлуком 02 број: 61206-2705/2-16 од 13.06.2016. године.

Верификација научних доприноса:

Kategorija M21:

1. **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Marina B. Dojčinović, Steva M. Lević, Viktor A. Nedović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. (2017) Effect of the Controlled High-Intensity Ultrasound on Improving Functionality and Structural Changes of Egg White Proteins, *Food and Bioprocess Technology*, vol. 10, no. 7, pp. 1224-1239, 2017 (**IF=2,576**) (ISSN 1935-5130).

Kategorija M22:

1. **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Sanja Ž. Grbavčić, Nataša Ž. Šekuljia, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. (2014) Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production, *European Food Research and Technology*, vol. 239 no. 6, pp. 979-993, 2014 (**IF=1,559**) (ISSN 1438-2377).

Kategorija M24:

1. Knežević-Jugović, Z., **Stefanović, A.**, Žuža, M., Milovanović, S., Jakovetić, S., Manojlović, V., Bugarski, B. (2012) Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins, *Acta Periodica Technologica*, vol. 43, pp. 33-41 (ISSN 1450-7188).

Докторска дисертација и реферат о оцени докторске дисертације достављају се на увид јавности, а по истеку рока од 30 дана, на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Одлуку доставити: Већу научних области техничких наука Универзитета, ментору, Служби за наставно-студентске послове, Библиотеци и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Андрее Стефановић, мастер инж. технологије.

Одлуком 35/95 бр. од 20.4.2017. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Андрее Стефановић под насловом

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

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

Школске 2011/12 године (14.10.2011.) кандидат Андреа Стефановић, мастер инж. технологије уписала је Докторске академске студије на Универзитету у Београду, Технолошко- металуршки факултет, профил Биохемијско инжењерство и биотехнологија.

3.3.2016. - Кандидат Андреа Стефановић, мастер инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме (бр. одлуке 35/97. од 3.3.2016.).

26.5.2016. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, на основу поднетог реферата комисије, донета је одлука (бр. 35/252) о прихватању предлога теме докторске дисертације Андрее Стефановић, мастер инж. технологије, под називом „Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“, а за ментора ове докторске дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а.

13.6.2016. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Андрее Стефановић, мастер инж. технологије, под називом „Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата

протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“.

20.4.2017. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука о именовању комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Андree Стефановић, мастер инж. технологије, под називом „Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета“ (бр. одлуке 35/95).

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство (ужа научна област Биотехнологија и биохемијско инжењерство) за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За ментора је изабрана др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а која је на основу објављених публикација и искуства компетентна да руководи израдом ове докторске дисертације

1.3. Биографски подаци о кандидату

Андреа Б. Стефановић, мастер инжењер технологије, рођена је 5. јануара 1987. године у Градацу. Основну школу, гимназију и средњу музичку школу завршила је у Бијељини. Студије на Технолошко-металуршком факултету (на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија) Универзитета у Београду уписала је 2006. године. Дипломирала је на истом факултету 22.9.2010. одбраном дипломског рада под називом “Производња млека без лактозе помоћу бета-галактозидазе” са оценом 10 (десет) чиме је стекла звање дипломирани инжењер технологије. Мастер академске студије, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, уписала је 2010. године. 26.9.2011. завршила је мастер академске студије на истом факултету одбраном мастер рада под називом „Ковалентна имобилизација пеницилин ацилазе из *Escherichia coli* на макропорозном кополимеру глицидилметакрилата и етиленгликолдиметакрилата“ са оценом 10 (десет) и просечном оценом током студирања 9,25, чиме је стекла звање мастер инжењер технологије. Дипломски рад, као и мастер рад, радила је на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета. Докторске студије, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, уписала је 2011. године. Положила је све испите предвиђене наставним планом докторских студија са просечном оценом 9,82. У звање истраживач приправник изабрана је 10.7.2012. године, а у звање истраживач сарадник 9.4.2015. године.

Од 1.1.2012. године запослена је као истраживач-сарадник на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. ИИИ46010, под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“. Од октобра 2016. године ангажована је на пројекту „Развој нових ензимских технологија за модификацију сојиних протеина и унапређење њихових функционалних својстава“ (ЕУРЕКА пројекат, бр. Е!9936 - SOYZYME). Од септембра 2015. године ангажована је у настави на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија на лабораторијским вежбама из предмета: Биотехнолошки практикум 2 и Ензимско инжењерство.

Коаутор је 10 (десет) радова у међународним часописима (категоризације М21а (један рад), М21 (три рада), М22 (три рада), М23 (два рада) и М24 (један рад), као и три рада у националним часописима (два рада категоризације М51 и један рад М52). Саопштила је у

сарадњи са коаторима 31 саопштење на домаћим и међународним скуповима (10 саопштења категоризације M33, 10 M34, 7 M64, 3 M63, и 1 M64).

У читавом овом периоду непосредно је учествовала у изради, организовању и извођењу 26 дипломских и мастер радова студената студијског програма Биохемијско инжењерство и биотехнологија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Андрее Стефановић написана је на 250 страна, са укупно 9 поглавља, 69 слика, 29 табела и 457 литературних навода. Докторска дисертација састоји се из следећих поглавља: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература, уз изводе на српском и енглеском језику.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У поглављу **Увод** приказан је кратак осврт на област истраживања, дефинисан је предмет истраживања и актуелност проблематике у свету, као и главни циљеви дисертације. Дата су основна разматрања о значају протеина беланцета и њихових хидролизата посматрана кроз њихова технолошко-функционална својства и потенцијалну употребу, са освртом на потребу примене одговарајућег претретмана у циљу побољшавања ових својстава. Акценат је стављен на предности примене ултразвучног претретмана у односу на традиционални термички претретман процесирања протеина хране. Посебна пажња посвећена је предностима примене ултразвучног претретмана непосредно пре ензимске хидролизе протеина беланцета, у односу на ензимску хидролизу без претретмана. На крају поглавља представљени су циљеви рада и план истраживања.

У **Теоријском делу** описана су физичко-хемијска својства протеина беланцета од значаја за њихову примену у прехранбеној индустрији. Потом су детаљно описана структура и својства појединачних фракција протеина беланцета и истакнут је њихов значај. У наставку је посебан осврт направљен на механизам дејства ултразвучних таласа, као и на потенцијалну комерцијалну примену ултразвука у прехранбеној индустрији. Технологија примене ултразвука високог интензитета (фреквенци од 16 до 100 kHz) може бити врло корисна код минималног процесирања протеинских сировина, јер се ограничава повишење температуре током третмана, и тиме омогућава очување сензорних и нутритивних својстава протеина. Пренос акустичне енергије кроз супстрат је брз и целовит, што омогућава редукцију укупног времена обраде и мању потрошњу енергије. Када се путем третирања сировине ултразвуком унесе тачно дефинисана, оптимална, количина топлотне и механичке енергије, добијају се обрађени протеини растворљиви у води који су лакше доступни дејству протеолитичких ензима и који имају жељена функционална својства. Истакнут је значај феномена кавитације који се сматра одговорним за промену хемијских, физичких и функционалних особина ултразвучно третираних узорака и дат је преглед најзначајних фактора који утичу на кавитацију. Такође, приказани су до сада утврђени утицаји ултразвучног третмана на технолошко-функционална својства протеина из различитих извора и направљен је детаљан преглед литературе, који даје увид у тренутно стање у области примене ултразвука заједно са анализом значајних параметара који утичу на исход побољшања физичко-хемијских својстава различитих протеина. Изложена је и теоријска основа Раманове спектроскопије са релевантним примерима студија спроведених на детекцији промене структуре протеина. Посебна пажња је посвећена технолошко-функционалним својствима протеина беланцета, која су поткрепљена релевантним примерима научних студија примене различитих врста уређаја за соникацију спроведених у циљу побољшања ових својстава. Исто тако, представљене су теоријске основе ензимске хидролизе протеина заједно са главним

проблемима који се јављају током хидролизе. Дефинисане су најчешће коришћене методе за одређивање степена хидролизе, као и фактори који утичу на саму ензимску реакцију хидролизе протеина. Представљене су важне карактеристике протеаза, укључујући њихову структуру, механизам деловања, специфичност и класификацију. Детаљно су окартерисане четири протеазе које су коришћене као биокатализатори у хидролизи протеина беланцета у оквиру ове дисертације.

У поглављу **Материјали и Методе** наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, а затим су наведене методе коришћене у току експерименталног рада и обраде резултата. Прво су описани услови и методе процесирања протеина беланцета ултразвуком у уређајима различите конструкције. Потом су описани начини извођења ензимске реакције хидролизе (једностепенa и двостепенa) протеина беланцета и изведен је емпиријски кинетички модел на основу ког су моделоване добијене криве хидролизе. Детаљно су описане и процедуре за одређивање функционалних својстава протеина беланцета, као и методе одређивања величине протеинских фракција (SDS - PAGE електрофорезом) добијених након ултразвучног претретмана. Такође, дата је и метода за одређивање расподеле величине честица и полидисперзног индекса ултразвучно претретираних протеина беланцета. Затим су описани поступци одређивања површинских карактеристика различито претретираних протеина беланцета. Наведени су услови при којима је вршено сушење течних хидролизата, као и методе за одређивање технолошко-функционалних, сензорних и органолептичких својстава добијених прахова. Описане су и методе за структурну и морфолошку карактеризацију ултразвучно претретираних протеина беланцета и њихових хидролизата. Промене у структури протеина беланцета након примене ултразвучног претретмана одређене су применом Раманове и FTIR спектроскопије, док је морфологија одређена техником скенирајуће електронске микроскопије са емисијом поља (FE-SEM). У складу са микробиолошком исправности и безбедности протеина беланцета урађене су микробиолошке анализе, а одређивање укупног садржаја микроорганизама вршено је на основу мерења степена редукције броја ћелија у физиолошком раствору у коме су селектовани микроорганизми били изложени дејству различито претретираних протеина беланцета.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду при изради ове дисертације, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са резултатима добијеним у радовима из литературе у сличним испитаним системима. У поглављу Резултати и дискусија налази се укупно 11 потпоглавља. У **првом потпоглављу** приказани су резултати утицаја дејства ултразвучних таласа на технолошко-функционална својства нативних протеина беланцета. Испитан је утицај дужине трајања ултразвучног претретмана изведен у уређајима различите конструкције и различитих фреквенци (20, 35 и 40 kHz) на растворљивост, капацитет пене, стабилност пене и емулгујућа својства протеина беланцета. Утврђен је пораст капацитета пене, стабилности пене, индекса активности емулзије и индекса стабилности емулзије нативних протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце 20 kHz (UZS-20 kHz), као и ултразвуком у купатилима фреквенце 40 kHz и 35 kHz (UZK-40 kHz и UZK-35 kHz). Време претретмана од 15 мин дало је најбоље резултате емулгујућих својстава и својстава пењења за сва три ултразвучна претретмана. Највеће повећање капацитета пене, стабилности пене, индекса активности емулзије и индекса стабилности емулзије забележено је након претретмана ултразвучном сондом UZS-20 kHz и уочена је зависност између стабилности пене, индекса активности емулзије и индекса стабилности емулзије и дужине претретмана, док се капацитет пене није статистички значајно мењао ($p > 0,05$) са променом времена претретмана.

У **другом и трећем потпоглављу** испитан је утицај дејства ултразвучних таласа различите фреквенце на површинске карактеристике молекула протеина беланцета и то садржај сулфхидрилних група и степен хидрофобности површине, као и на расподелу величина честица (агрегираних молекула) протеина. Како је беланце веома сложен систем који се састоји из више од тридесет различитих протеинских фракција, да би се утврдио механизам

деловања ултразука високог интензитета на протеине беланцета, такође је испитан и утицај ултразука генерисан сондом фреквенце 20 kHz на расподелу величина честица и структуру модел протеина беланцета, овалбумина. Наиме, овалбумин је усвојен као модел протеин јер је највише заступљен у беланцету (око 55%). Ова испитивања су омогућила значајне увиде у механизам деловања ултразвука на протеине беланцета и успостављање корелација између величине честица и њиховог површинског наелектрисања и неких од технолошко-функционалних својстава протеина беланцета попут растворљивости, капацитета и стабилности пене и емулгујућих својстава. Тако, добијена је негативна линеарна корелација између величине честица и растворљивости протеина беланцета након примене UZS-20kHz, а међусобна зависност између индекса активности емулзије и индекса стабилности емулзије и величине честица је, такође, потврђена и установљено је да са смањењем честица долази до побољшања емулгујућих својстава. Уочена је линеарна корелација између зета потенцијала и оствареног повећања растворљивости протеина беланцета, капацитета пењења и стабилности пене након ултразвучног претретмана, док директна корелација између зета потенцијала и индекса емулгујућих својстава није установљена.

У **четвртм потпоглављу** наставило се са испитивањем утицаја ултразвука различите фреквенце на морфологију честица протеина беланцета и добијени резултати су упоређени са морфологијом честица добијених након примене конвенционалног термичког третмана. У петом потпоглављу приказана је структурна анализа различито претретираних протеина беланцета и приказане су промене секундарне структуре изазване применом ултразвучног претретмана. Показано је да су ултразвучни претретмани протеина беланцета са сондом UZS-20kHz, као и у купатилу UZK-40kHz, утицали на промену секундарне структуре протеина, тако што се смањује удео α -завојнице, али видљиве су промене и унутар дисулфидног региона, чиме је потврђен и објашњен повећан садржај сулфхидрилних група након оба ултразвучних претретмана. При томе, претретман ултразвучном сондом UZS-20kHz показао је већи утицај на структурна својства.

Унутар **шестог потпоглавља** испитан је утицај различитих претретмана на укупан садржај микроорганизама присутних у третираном беланцету. Како је безбедност хране један од најважнијих захтева који се намеће произвођачима, испитивање потенцијала примене ултразвука високог интензитета, као корака пре ензимске хидролизе уместо традиционалног термичког поступка, важно је и са аспекта смањења броја или чак уништења микроорганизама. Микробне културе које су коришћене у овим испитивањима биле су: *Salmonella enteritidis* и *Enterobacteriaceae*. Забележен је смањен број аеробних бактерија након претретмана сондом UZS-20kHz, док применом UZK-35kHz и UZK-40kHz није забележено смањење броја аеробних бактерија које формирају колоније. Присуство *Salmonella enteritidis* и *Enterobacteriaceae* није детектовано ни у једном узорку.

У **седмом потпоглављу** изведена је оптимизација ензимске хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета у шаржном реакторком систему. У ту сврху коришћене су различите протеазе у оквиру једноступеног и двоступеног ензимског поступка и урађена су прелиминарна истраживања са аспекта брзине реакције и приноса пептида, али и са аспекта технолошко-функционалних својстава. Применом једноступеног ензимског поступка, ендопротеаза из *Bacillus licheniformis* (комерцијалан назив алкалаза) се показала као најефикаснија међу испитаним протеазама које делују по ендо- и егзо-механизму, док је у двоступеном ензимском поступку комбинација ензима алкалазе и неутразе дала највеће приносе пептида и степене хидролизе. У свим испитаним случајевима ензимска хидролиза је допринела повећању растворљивости и сварљивости протеина беланцета што је од изузетног значаја за формулацију напитака и протеинских суплемената за спортисте, рекреативце и особе са поремећеним радом дигестивног тракта на специјалном дијететском режиму исхране. Показано је да су хидролизати добијени из ултразвучно претретираних протеина беланцета имали боља функционална својства од оних из термички претретираних, што указује да је ултразвучни претретман изазвао промене у структури протеина, утичући најпре на повећање неуређености структуре и хидрофобности површине (што је потврђено у

претходном поглављу), што је у одређеној мери сачувано или чак повећано након дејства различитих протеаза. На тај начин ултразвук је унапредио својства пењења или емулговања хидролизата. Генерално, у поређењу са једностепеном ензимском хидролизом, двостепени ензимски поступак није статистички значајно ($p < 0,05$) утицао на побољшање функционалних својстава ултразвучно претретираних хидролизата, а третмани са егзопептидазама су се показали практичним и ефикасним за регулисање горчине протеинских хидролизата.

У **осмом потпоглављу** дефинисани су процесни параметри при претретману протеина беланцета ултразвуком који су оптимални са аспекта извођења ензимске хидролизе, али и са аспекта технолошко-функционалних својстава протеина беланцета и њихових хидролизата. Као биокатализатор коришћена је ендопроотеаза која се показала као најефикаснија, а то је протеаза из *B. licheniformis* (алкалаза). У том смислу испитан је утицај фреквенце и јачине ултразвучних таласа, конструкције уређаја за соникацију, времена трајања самог претретмана као и рН раствора протеина на брзину ензимске реакције, али и технолошко-функционална својства хидролизата. Пронађени су оптимални услови претретмана који су довели до постизања високих приноса реакције. Као најефикаснији показао се претретман ултразвучном сондом UZS-20kHz од 15 мин при рН раствора беланцета 9,2. Ови резултати су потпуно у складу са утврђеним променама у структури протеина беланцета услед дејства ултразвука фреквенце 20 kHz у току 15 мин. При третманима сондом дужим од 15 минута долази до значајног смањења брзине ензимске реакције и нежељених промена функционалних својстава као, на пример, до стварања замућеног, непровидног гела услед агрегирања молекула протеина, и услед тога смањене растворљивости протеина.

У **деветом потпоглављу** покушано је да се квантитативно одреди утицај ултразвука генерисан ултразвучном сондом и купатилима различите снаге на брзину ензимске реакције. Испитан је утицај почетне концентрације ензима и супстрата на брзину реакције, при чему су експериментално добијени подаци моделовани емпиријским кинетичким моделом који узима у обзир инхибицију супстратом у вишку и деактивацију ензима у складу са кинетиком другог реда у току времена. Након тога, из емпиријске једначине усвојеног кинетичког модела, одређене су кинетичке константе методом линеарне регресије. Највећа константа брзине реакције добијена је након претретмана ултразвучном сондом UZS-20kHz, док је најмање повећање брзине реакције остварено након претретмана UZK-35kHz. Генерално, смањена инхибиција ензима супстратом, као и повећање активности ензима и брзине реакције, који су утврђени испитивањем кинетике реакције и одређивањем кинетичких константи, говоре да је дошло до унапређења ензимске хидролизе протеина беланцета претретираних са сва три различита ултразвучна претретмана у поређењу са контролом.

У **десетом потпоглављу** детаљно су анализирана површинска и структурна својства, као и технолошко-функционална својства хидролизата добијених са алкалазом и папаином из протеина беланцета који су претходно третирани ултразвучном сондом фреквенце 20 kHz. Конкретно испитан је утицај дужине ултразвучног претретмана и врсте ензима на растворљивост, својства пењења, емулгациона својства и садржај сулфхидрилних група хидролизата, као и на степен хидрофобности, зета потенцијал и структуру пептида у хидролизату. На основу добијених резултата, који су показали да хидролизати добијени ензимском хидролизом претходно претретираних протеина беланца ултразвуком поседују већу растворљивост, капацитет и стабилност пене, веће индексе активности и стабилности емулзије у поређењу са хидролизатима добијеним из интактних (нетретираних) протеина беланцета, јасно је да су побољшана технолошко-функционална својства хидролизата директна последица промене структуре протеина беланцета изазване ултразвучним таласима мале фреквенце велике снаге, чији је утицај делимично задржан и након ензимске хидролизе. Међутим, како долази до раскидања пептидних веза у молекулу под дејством алкалазе или папаина у току хидролизе, наравно да се може причати само о комбинованом утицају ултразвука и ензима.

У **једанаестом потпоглављу** приказани су резултати оптимизације и избора техника сушења хидролизата протеина беланцета. Оптимизован је процес сушења и добијени прахови су окарактерисани са аспекта органолептичких, функционалних и сензорних својстава.

У поглављу **Закључак** јасно и прегледно су изнети закључци изведени на основу резултата представљених у претходним поглављима који су у сагласности са постављеним циљевима рада.

У поглављу **Литература** дат је списак коришћене литературе.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Услед негативних ефеката термичке обраде природних протеина, развој иновативних нетермичких технологија и нових метода, које ће побољшати технолошко-функционална својства нативних протеина, предмет су актуелних истраживања. Већа комерцијална примена хидролизата протеина беланцета је за сада ограничена услед неадекватног процесног третмана при обради и стерилизацији беланцета као и хемијској хидролизи протеина, који доведе до значајне промене боје, укуса, функционалности и нутритивних својстава производа. Највише негативних пропратних ефеката има термички претретман беланцета на високим температурама при којем се одвија сложена Мајлардова и друге реакције, што доводи до тамњења производа и настајања једињења са токсичним, мутагеним и тератогеним ефектима. Такође, током термичког поступка у благо алкалној средини долази до неселективне и неконтролисане хидролизе протеина, као и њихове иреверзибилне денатурације, тако да се значајно смањује и нутритивна вредност производа. Због тога, као алтернатива традиционалној термичкој обради све више се испитују нетермички третмани беланцета и ензимска хидролиза, због великог броја предности и дугорочних ефеката производње који се могу постићи.

Ензимска хидролиза протеина као и примена нетермичких третмана попут технологије ултразвука високог интензитета свакако није нов проблем и у литератури постоји велики број радова и патената који разматра ову тематику. Међутим, у наведеним радовима из литературе углавном су коришћени модел протеини беланцета (најчешће лизозим, овалбумин и овотрансферин). На основу увида у литературу, нема много радова који се баве применом нетермичких претретмана и ензимском хидролизом сложене смеше протеина присутних у беланцету, док су истраживања у оквиру ове докторске дисертације управо базирана на испитивању утицаја ултразвука под различитим условима на целокупну смешу протеина беланцета, што уједно представља савременост и оригиналност научног истраживања. Истраживања у оквиру ове дисертације су разматрана са више аспеката, на пример, задржавању одговарајућих нутритивних својстава уз побољшана технолошко-функционална и органолептичка својства протеина беланцета, што није једноставан задатак и захтевао је примену одговарајућег ултразвучног третмана као и више од једне протеазе у једноступеном или вишеступеном ензимском процесу. Показано је да је најефикасније протеине беланцета физичко-хемијским третманом „припремити“ за ензимску хидролизу, односно денатурирати, тако да се пептидне везе у унутрашњости молекула изложе дејству протеаза. Оптимизација ензимског процеса хидролизе вршена је уз паралелну оптимизацију ултразвучног претретмана, јер се зна да су интактни протеини беланцета недоступни дејству протеаза без претходног претретмана који може значајно утицати на њихова функционална својства. Како примена претретмана доводи до усложњавања и поскупљивања целокупног процеса, процес оптимизације је пажљиво спроведен како са аспекта функционалних својстава протеина, тако и са аспекта ефекта на саму ензимску хидролизу протеина беланцета и укупне перформансе процеса.

Технологија примене ултразвука високог интензитета (фреквенци од 16 до 100 kHz) може бити врло корисна код минималног процесирања протеинских сировина, јер се ограничава повишење температуре током третмана, и тиме омогућава очување сензорних и нутритивних својстава компонената. Мали број радова, који се баве проблематиком третирања протеина беланцета ултразвуком пре ензимске производње хидролизата, не разматрају технолошко-функционална својства добијених производа, као ни утицај претретмана на структуру и функционалност протеина беланцета, већ само утицај ултразвука на саму ензимску реакцију. Веома је важно да у току претретмана не дође до нежељених промена функционалних својстава као, на пример, до стварања замућеног, непровидног гела услед агрегирања молекула протеина, и услед тога смањене растворљивости протеина. Познато је да третирање протеина ултразвуком може довести до ових нежељених промена под одређеним условима, али је, генерално, механизам деловања ултразвука на протеине другачији него механизам деловања топлотом. Полазећи од чињенице да ултразвук значајно утиче на секундарну, терцијарну и кватернарну структуру протеина, од којих је терцијарна изузетно важна за функционалност протеина, као и да доводи до повећања хидрофобности површине и броја сулфхидрилних група на површини молекула које су одговорне за већи број дисулфидних мостова и формирање мањих агрегата него под утицајем топлоте, објашњава се зашто се под дејством ултразвука добијају растворљивији протеини, веће конформационе покретљивости и доступности протеазама. Такође, неопходно је обратити пажњу на фреквенцију и јачину ултразвучних таласа, врсту и конструкцију уређаја за соникацију, као и на време трајања самог претретмана.

Водећи се горе поменути ставкама, у оквиру ове докторске дисертације дефинисани су процесни параметри при претретману протеина беланцета ултразвуком који су оптимални са аспекта извођења ензимске хидролизе, али и са аспекта технолошко-функционалних својстава протеина беланцета и њихових хидролизата. Основни циљ ове дисертације је био да се допринесе развоју ензимског процеса хидролизе протеина беланцета и оптимизацији ултразвучног претретмана као адекватној замени за традиционални термички претретман процесирања протеина хране у прехранбеној индустрији чиме су испуњени захтеви за савременост и оригиналност научног истраживања спроведеног у оквиру ове дисертације.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Током израде докторске дисертације кандидат је извршио детаљан преглед научне и стручне литературе из релевантних научних области везаних за проблематику докторске дисертације. Цитирана су 457 литературна навода која су омогућила да се јасно представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Већину прегледане литературе чине радови публиковани у врхунским међународним часописима од стране еминентних стручњака у испитиваној научној области. На основу овог пресека стања у литератури изложене су основне смернице за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из пописа литературе која је коришћена у истраживању, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

У пријави докторске дисертације су постављени задаци који су остварени коришћењем одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и обрадом података.

Промене у структури протеина беланцета након ултразвучног претретмана праћене су помоћу Раманове и FTIR спектроскопије. Као контролни узорак коришћен је осушени

нетретирани водени раствор протеина беланцета. Раманова спектроскопија одлично детектује чак и веома мале промене у секундарној структури протеина на основу промене интензитета и положаја пикова, нарочито у области амида I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$), амида II ($1510\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$) и амида III ($1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$). Расподела величине честица и полидесперзни индекс протеина беланцета након одговарајућих ултразвучних претретмана одређени су применом технике динамичког расипања светлости помоћу Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Исти уређај коришћен је за одређивање зета-потенцијала ултразвучно претретираних протеина беланцета дајући информацију о мери стабилности честица унутар датог система. Површинска хидрофобност ултразвучно претретираних протеина беланцета одређена је спектрофлуорометријски помоћу спектрофлуориметра (Horiba FluoroMax[®] 4) према модификованој методи из литературе.

Ензимска реакција хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета изведена је у шаржном реактору са аутоматском контролом температуре $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и вредности $\text{pH} \pm 0,1$ уз контролисано мешање и остале хидродинамичке услове. Напредовање и ток ензимске реакције праћен је на основу степена хидролизе који је директно пропорционалан количини α -амино група које се ослободе у току реакције и количини утрошене базе за одржавање константне pH вредности. Уклањање соли из хидролизата након завршене хидролизе обављено је процесом дијализе помоћу црева за дијализу. У циљу добијања прашкастих производа сви хидролизати осушени су техником спреј сушења и лиофилизацијом и испитан је утицај спреј сушења и сушења лиофилизацијом на технолошко-функционална својства финалне формулације производа. Сва испитивања изведена су према оригиналним или модификованим методама из литературе.

Морфологија ултразвучно претретираних протеина беланцета и њихових хидролизата одређена је техником скенирајуће електронске микроскопије помоћу електронског микроскопа (TESCAN MIRA3 XMU). Од технолошко-функционалних и физичко-хемијских својстава претретираних протеина и хидролизата у оквиру ове докторске дисертације разматрани су: капацитет и стабилност пене, емулгациона својства, растворљивост, однос укупног садржаја сулфхидрилних група и реактивних група на површини молекула, сварљивост, редукујућа моћ. Растворљивост протеина беланцета одређена је спектрофотометријски. Капацитет и стабилност пене ултразвучно претретираних протеина беланцета и њихових хидролизата одређена је на уређају (Yellowline, DI 25 basis, Ica Works Inc., Wilmington, 600 W, 50 V, 8000-24000 rpm). Овај метод се састоји у снажном мешању узорка на константној температури и при константном великом броју обртаја, што проузрокује стварање пене, и читавању висине пене после заустављања мешања. Капацитет пењења се изражава као релативно повећање запремине одмах након завршетка мешања, док се стабилност пене изражава као релативно повећање запремине пене 30 минута након завршетка мешања. Емулгациона својства одређена су спектрофотометријском методом и изражена су кроз индексе емулгационе активности и емулгационе стабилности. Сварљивост и редукујућа моћ мерена су спектрофотометријски према модификованим методама из литературе. Горчина хидролизата, који су претходно осушени спреј сушењем и/или лиофилизацијом, одређена је на основу субјективног осећаја шест индивидуа при концентрацији пептида 30 mg cm^{-3} и изражена је у јединицама концентрације раствора кофеина исте горчине. Мерење координата боје осушених и таблетираних хидролизата беланцета (CIE , L^* , a^* , b^*) одређено је помоћу Datacolor SF300 UV рефлексионог спектрофотометра, користећи извор светлости D65 при стандардном углу посматрача од 10° . Садржај пепела, липида, протеина и укупних угљених хидрата одређен је помоћу AOAC стандардних метода. Дистрибуција молекулске масе хидролизата одређена је методом SDS-PAGE електрофорезе која се изводила у јединици за хоризонталну и вертикалну електрофорезу (Amersham Biosciences).

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа до сада објављених експерименталних података и резултата приказаних у оквиру ове докторске дисертације, остварен је значајан допринос у могућности имплементације ултразвучног претретмана са циљем побољшања технолошко-функционалних својстава нативних протеина беланцета и хидролизата протеина беланцета. Резултати добијени у току рада на овој докторској дисертацији дају значајан научни допринос објашњењу механизма деловања ултразвучних таласа, како на структуру комплексне смеше протеина беланцета, тако и на структуру модел протеина, овалбумина. На основу дефинисаног утицаја ултразвука одређене фреквенце и снаге под контролисаним условима (одржавање константне температуре, јонске јачине, рН раствора) на површинске карактеристике молекула протеина беланцета попут хидрофобности површине и зета потенцијала, као и њихових функционалних својстава, успостављене су важне корелације на основу којих се може теоретски предвидети утицај ултразвука на растворљивост, капацитет пене и стабилност пене. Нажалост, није успостављена корелација између емулгујућих својстава са површинским карактеристикама молекула протеина, као ни са величином честица (степен агрегације), али је утврђен велики утицај промене секундарне структуре на емулгујућа својства. Примена различитих ултразвучних уређаја, са опсегом фреквенци од 20-40 kHz, као и варирање услова извођења самог претретмана (снага ултразвучних таласа, дужина трајања претретмана, радна температура) изазвала је велике промене у структури протеина настале услед кавитационог дејства ултразвучних таласа, формирања/разлагања агрегата протеина, као и промене морфологије и величине честица претретираних протеина. Синергистички ефекат ултразвучног претретмана и накнадне ензимске хидролизе детаљно је објашњен и њихов утицај на побољшана функционална својства протеина беланцета сматра се значајним доприносом у разумевању механизма деловања ултразвучних таласа на денатурацију протеина. Развијена метода ултразвучног претретмана и накнадне ензимске хидролизе се може сматрати погодним избором за потребе добијања економски исплативих количина функционалних хидролизата из протеина беланцета. Добијени хидролизати поседују унапређена функционална својства, у тој мери довољна, да се могу корисити као адитиви храни и/или дијететски суплементи. Финални резултат дисертације је потпуно окарактерисан хидролизат протеина беланцета у форми праха који као такав има велики потенцијал за различите примене. Резултати и закључци изнети у овој дисертацији представљају основу за даљи развој функционалних прехранбених производа на бази протеина беланцета.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Андреа Стефановић, мастер инжењер технологије, је током израде докторске дисертације испољила изузетну стручност у припреми и реализацији експеримената и коришћењу различитих техника и метода, а при анализи резултата је показала самосталност, систематичност и креативност. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Главни научни допринос ове докторске дисертације представља развој иновативног технолошког поступка који се користи на комбинованој примени ултразвука одређене фреквенце и интензитета и парцијалне ензимске хидролизе за добијање хидролизата

протеина беланцета одређених технолошко-функционалних својстава, који подразумева неколико појединачних доприноса:

- Нова сазнања о могућности примене ултразвучног претретмана за обраду протеина беланцета насупротив конвенционалном термичком третману;
- Оптимизација процесних параметара при обради беланцета ултразвуком високог интензитета са аспекта технолошко-функционалних својстава протеина беланцета као и брзине консекутивне ензимске хидролизе;
- Дефинисање утицаја ултразвучног претретмана при различитим условима на структуру, површинске карактеристике и технолошко-функционална својства протеина беланцета;
- Дефинисање утицаја специфичности ендо- и екзопроотеаза на технолошко-функционална својства хидролизата протеина беланцета у једностепеним (дејство једне протеазе) и двостепеним (дејством две протеазе) ензимским процесима;
- Увид у механизам деловања ултразвука на протеине беланцета и успостављање корелација између величине честица и њиховог површинског наелектрисања и неких од технолошко-функционалних својстава протеина беланцета попут растворљивости, капацитета и стабилности пене и емулгујућих својстава;
- Подешавање процесних параметара ензимске хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета у шаржном реакторском систему;
- Испитивање кинетике ензимске реакције хидролизе протеина у циљу добијања пројектних једначина неопходних за пројектовање и дизајн шаржног ензимског реактора за производњу хидролизата протеина беланцета;
- Оптимизован је процес спреј сушења у циљу добијања спрашених хидролизата протеина беланцета жељених карактеристика;
- Потпуно окарактерисан хидролизат протеина беланцета у течной форми и осушен у виду праха.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне литературе из ове области истраживања која разматра ензимске процесе за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране, као и разматрањем резултата добијених у овој докторској дисертацији, уочава се да резултати из ове докторске дисертације значајно допуњују постојећа сазнања из поменуте области. Наиме, оптимизацијом кључних реакционих фактора и успешном имплементацијом ултразвучног претретмана, значајно су унапређена технолошко-функционална својства протеина беланцета, а уједно и повећана ефикасност ензимске хидролизе. Развојем ефикасног ензимског поступка у шаржном реакторском систему, као и успостављањем одговарајућег кинетичког модела постављени су основи за увећање размера и аутоматизацију процеса добијања хидролизата протеина беланцета са тачно дефинисаним функционалним својствима. Посебан значај има одабир одговарајуће технике сушења течних хидролизата у циљу добијања спрашених хидролизата протеина беланцета жељених карактеристика.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Андреа Стефановић је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштењима на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су до сада у оквиру три рада у научним часописима међународног значаја (категоризације М21-један рад, М22-један рад и М24-један рад), један рад у водећем часопису националног значаја (М51) и тринаест саопштења на међународним и националним скуповима од којих су пет штампани у целини. Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области

биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још седам радова у часописима међународног значаја, два рада у часописима националног значаја, поглављу у монографији водећег међународног значаја и дванаест саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

Категорија M21:

1. **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Marina B. Dojčinović, Steva M. Lević, Viktor A. Nedović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. Effect of the Controlled High-Intensity Ultrasound on Improving Functionality and Structural Changes of Egg White Proteins, *Food and Bioprocess Technology*, vol. 10, no. 7, pp. 1224-1239, 2017 (**IF=2,576**) (ISSN 1935-5130).

Категорија M22:

1. **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Sanja Ž. Grbavčić, Nataša Ž. Šekuljia, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production, *European Food Research and Technology*, vol. 239 no. 6, pp. 979-993, 2014 (**IF=1,559**) (ISSN 1438-2377).

Категорија M24:

1. Knežević-Jugović, Z., **Stefanović, A.**, Žuža, M., Milovanović, S., Jakovetić, S., Manojlović, V., Bugarski, B.: Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins, *-Acta Periodica Technologica*, vol. 43, pp. 33-41 (ISSN 1450-7188).

Категорија M51:

1. **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Marina Dojčinović, Steva Lević, Milena Žuža, Viktor Nedović, Zorica Knežević-Jugović. Impact of high-intensity ultrasound probe on the functionality of egg white proteins, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, vol. 6, pp. 215-224, 2014 (ISSN 1857-8489).

Категорија M33:

1. Zorica D. Knežević-Jugović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Mirjana G. Antov, Picazo Espinosa Rafael, Verica Manojlović, Branko Bugarski. Enzymatic Production of Bioactive Protein Hydrolysates from Egg White: Effects of Egg White Protein Pretreatment, *Proceedings of the 39th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 21-25. May, 2012, Proceedings, pp. 1419-1425 (ISBN 978-80-89475-04-9).
2. Z. Knežević-Jugović, **A. Stefanović**, M. Žuža, B. Jugović, M. Gvozdenović, M. Antov, B. Bugarski. Functionality and antioxidant properties of hydrolysates of egg white proteins as influenced by type of protease, *Proceedings of the 3rd International Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, M. Gligorić, ed., Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 4-6. March, 2013, Proceedings, pp. 678-685 (ISBN 978-99955-81-11-4).
3. Zorica Knežević-Jugovic, Ana Gluvic, Milena Žuža, **Andrea Stefanovic**, Milica Gvozdenovic, Branimir Jugovic, Mirjana Antov. Effects of hydrolysis degree and type of protease on antioxidant activity and functionality of egg white protein hydrolysates, *Proceedings of the 40th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 27-31. May, 2013, Proceedings, pp. 1432-1439 (ISBN 978-80-89475-09-4).
4. 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, 26-30 May 2014, pp. 126–135 (ISBN 978-80-89475-13-1).

5. **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Sanja B. Stojaković, Branimir Z. Jugović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. Enhancing protein release and functionality of soy proteins from defatted soy flakes using high-intensity ultrasound-assisted extraction, *V međunarodni kongres "Inženjerstvo, ekologija i materijali u procesnoj industriji"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 15-17. mart 2017, pp. 324-334, (UDK:543.384:637.413).

Kareriopija M34:

1. **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Ana Gluvić, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović. Kinetic model of the hydrolysis of egg white proteins by Alcalase, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., pp. 235., CD Proceedings (ISBN 987-86-7132-053-5.)
2. Zorica Knežević-Jugović, Milena Žuža, Ana Gluvić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Verica Manojlović, Branko Bugarski. Biochemical and functional properties of egg white hydrolysates produced by different proteases, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., pp. 232. CD Proceedings (ISBN 987-86-7132-053-5).
3. Nevena Luković, Sonja Jakovetić, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Nataša Šekuljica, Zorica Knežević-Jugović. Production of antioxidative egg-white hydrolysates in a circle batch membrane reactor, *7th Central European Congress Food-CEFood, Food Chain Intergadion*, Ohrid, Macedonia, 21-24 May 2014, Book of Abstract, pp. 220 (ISBN 987-608-4565-05-5).
4. Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Nataša Šekuljica, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović. Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis, *Food Quality & Safety, Health & Nutrition 1st Conference*, 27-29 November 2014, Skopje, Macedonia, Book of Abstract, pp. 76 (ISBN 978-608-4565-06-2).
5. 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, 25-29 May 2015, pp.753–753 (ISBN 978-80-89475-14-8).
6. **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, pp. 43 (ISBN 978-989-99361-9-5).

Kareriopija M63:

1. **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Ana D. Gluvić, Verica B. Manojlović, Dejan I. Bezbradica, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from egg white: effects of ultrasound on egg white proteins, *50. Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, CD sa objavljenim radovima, Beograd, 2012, BT P3, pp. 186-190 (ISBN 978-86-7132-049-8).

2. Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Milena Žuža, Nataša Šekuljica, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Zorica Knežević-Jugović. Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije, u: Vladimir Dasković i Dušan Marković (ur.): *XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak 07-08. Mart 2014., Zbornik radova, vol. 19, no. 21, pp. 281-285 (ISBN 987-86-87611-31-3).

Kategorija M94:

1. Diana Bugarski, Zorica Knežević-Jugović, Ivana Okić Đorđević, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Sanja Grbavčić, Branko Bugarski. Dijetetski suplement na bazi bioaktivnih peptida sa antioksidativnom i antitumorskom aktivnosti, *patentna prijava P-2015/0361*, Glasnik intelektualne svojine, broj 2/2017, 28. februar 2017, Zavod za intelektualnu svojinu, Beograd, Republika Srbija.

Остали научни радови кандидата

Kategorija M21a:

1. Abdalla Ali Salim, Sanja Ž. Grbavčić, Nataša Ž. Šekuljica, **Andrea B. Stefanović**, Sonja M. Jakovetić Tanasković, Nevena D. Luković, Zorica D. Knežević-Jugović. 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*, vol. 228, pp. 193–200, 2017 (**IF=5.651**) (ISSN 0960-8524).

Kategorija M21:

1. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Dragana Z. Dragana Z. Čičkarić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović. Decolorization of Anthraquinonic Dyes from Textile Effluent Using Horseradish Peroxidase: Optimization and Kinetic Study, *The Scientific World Journal*, vol. 2015, Article ID 371625, 12 pages, (2015), (**IF=1,219**), (ISSN: 1532 2246).
2. Zorica D. Knežević-Jugović, Milena G. Žuža, Enis S. Džunuzović, Sonja M. Jakovetić, **Andrea B. Stefanović**, Katarina B. Jeremić, Slobodan M. Jovanović. An approach for the improved immobilization of penicillin G acylase onto macroporous poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenglycoldimethacrylate) as a potential industrial biocatalyst, *Biotechnology Progress*, vol. 32, no. 1, pp. 43-51, 2016 (**IF=2,149**) (ISSN 1520-6033).

Kategorija M22:

1. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Veljko R. Đokić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović. Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 39, pp. 461–472, 2016 (**IF=1,870**) (ISSN 1615-7591).
2. Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Nataša Ž. Šekuljica, Sonja M. Jakovetić Tanasković, Marina B. Dojčinović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. Ultrasound pretreatment as a useful tool to enhance egg white protein hydrolysis: kinetics, reaction model and thermodynamics, *Journal of Food Science*, vol. 81, no. 11, pp. C2664-C2675, 2016 (**IF=1,815**) (ISSN 0022-1147).

Kategorija M23:

1. Šekuljica Nataša Ž., Prlainović Nevena Ž., Jovanović Jelena R., **Stefanović Andrea B.**, Grbavčić Sanja Ž., Mijin Dušan Ž., Knežević-Jugović Zorica D. Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye, *Hemijska industrija*, vol. 70, pp. 217-224, 2016 (IF=0,459) (ISSN 0367-598X).
2. Jovanović Jelena R., **Stefanović Andrea B.**, Žuža Milena G., Jakovetić Sonja M., Šekuljica Nataša Ž., Bugarski Branko M., Knežević-Jugović Zorica D. Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration, *Hemijska industrija*, vol. 70, pp. 419-428, 2016 (IF=0,459) (ISSN 0367-598X).

Kareriopija M51:

1. Dragana Mladenovic, Jelena Pejin, Suncica Kocic-Tanackov, **Andrea Stefanovic**, Aleksandra Djukic-Vukovic, Ljiljana Mojovic. Potato stillage and sugar beet molasses as a substrate for production of lactic acid and probiotic biomass, *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, vol. 20, no. 1, pp. 17-20, 2016 (ISSN 1821-4487).

Kareriopija M52:

1. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., **Stefanović, A. B.**, Jovanović, J. R., Jakovetić, S. M., Knežević-Jugović, Z. D., Mijin, D. Ž. The oxidation of anthraquinone dye using HRP immobilized as a cross-linked enzyme aggregates, *Advance Technology*, vol. 5, no. 2, pp. 18-26, 2016 (ISSN 2406-2979).

Kareriopija M33:

1. Zorica D. Knežević-Jugović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Nataša Ž. Šekuljica, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski. Antioxidant activity of peptide fractions obtained by membrane ultrafiltration of egg white protein enzymatic hydrolysates, Editor: Gligorić, M., In *Proceedings of the IV Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04-06. march 2015, pp. 278-287, CD Proceedings (ISBN 978-99955-81-18-3).
2. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović. Kaolin as a support for the immobilization of horseradish peroxidase: application in anthraquinonic dyes decolorization from wastewater, Editor: Gligorić, M., In *Proceedings of the IV Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04-06. march 2015, pp. 287-292, CD Proceedings (ISBN 978-99955-81-18-3).
3. 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, 25-29 May 2015, pp. 732–739 (ISBN 978-80-89475-14-8).
4. 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, 23-27 May 2016, pp. 874–882 (ISBN 978-80-89597-35-2).
5. Zorica Knežević-Jugović, Mohamed Elmalimadi, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Sonja Jakovetić Tanasković, Branko Bugarski. Antioxidant properties of hydrolysates of wheat gluten as influenced by process conditions, *V međunarodni kongres "Inženjerstvo*,

Категорија М34:

1. M. Carević, M. Stojanović, M. Mihailović, **A. Stefanović**, S. Grbavčić, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica. The immobilization of β -galactosidase on chemically modified immobilization supports, *2nd FCUB Workshop Food Technology and Biotechnology*, 18.-19. oktobar 2011, Beograd, P-26.
2. Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Milica Carević, Zorica Knežević-Jugović. The kinetic study of oleyl cinnamate synthesis, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., pp. 246., CD Proceedings (ISBN 987-86-7132-053-5).
3. Aleksandra Đukić-Vuković, Dragana Mladenović, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Zorica Knežević-Jugović, Jelena Pejin, Ljiljana Mojević. 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, 6-10 September 2015, Wed-C1-P7, Programme and book of abstracts, pp. 112 (ISBN 978-961-243-284-3).
4. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović. Dekolorizacija antrahinonskih boja iz otpadnih voda imobilisanom peroksidazom iz rena, *XI simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj*, Zbornik radova, 2015, pp. 67, Leskovac.
5. 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, pp. 62 (ISBN 978-989-99361-9-5).

Категорија М63:

1. Milena Žuža, Ana Gluvić, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Zorica Knežević-Jugović. Antioksidativna aktivnost hidrolizata belanceta i njegovih frakcija dobijenih membranskom ultrafiltracijom, u: Vladimir Dasković i Dušan Marković (ur.): *XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak 07-08. Mart 2014., Zbornik radova, vol. 19, no. 21, pp. 275-279 (ISBN 987-86-87611-31-3).

Категорија М14:

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, pp. 75-91 (ISSN: 1064-3745) (ISBN: 978-1-4939-6497-0).

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Андреје Стефановић, мастер инж. технологије под називом „Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом

технологије ултразвука високог интензитета” сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на конференцијама од међународног и националног значаја. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научноистраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „Оптимизација ензимских поступака за добијање хидролизата протеина беланцета као компонената функционалне хране применом технологије ултразвука високог интензитета” кандидата Андрее Стефановић прихвати, изложи на увид јавности и упути на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Проф. др Бранко Бугарски, редовни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Проф. др Марица Ракин, редовни професор,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Проф. др Мирјана Антов, редовни професор,
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет

Др Сања Грбавчић, научни сарадник,
Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета у Београду