

**ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ**

35/53
(Број захтева)
30.04.2018.
(датум)

**Образац 2
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ
НАУКА**

(назив већа научне области коме се захтев упућује)

Београд, Студентски трг бр. 1

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета у Београду” број 162/11, пречишћен текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата:

Mohamed Bashir Elmalimadi, мастер инжењера

КАНДИДАТ: **Mohamed Bashir Elmalimadi** пријавио је докторску дисертацију под називом:
„Функционална и биолошка својства пшеничног глутена модификованог ензимским поступцима (Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten)”

Из научне области: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Универзитет је дана **05.06.2017.** године, својим актом **61206-1883/2-17**, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

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

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **Mohamed Bashir Elmalimadi** образована је на седници Наставно-научног већа одржаној **30.11.2017.** године Одлуком Факултета под бр. **35/477**, 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	Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **22.02.2018.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 104. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 40. Статута ТМФ-а и чл. 39. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 22.02.2018. 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, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Функционална и биолошка својства пшеничног глутена модификованог ензимским поступцима (Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten)“** коју је поднео **Mohamed Bashir Elmalimadi**, мастер инжењер 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 Mohamed Bashir Elmalimadi, под називом **„Функционална и биолошка својства пшеничног глутена модификованог ензимским поступцима (Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten)“** Одлуком број: 61206-1883/2-17 од 05.06.2017. године.

Верификација научних доприноса:

Kategorija M21a:

1. **Elmalimadi, M.B.**, Jovanović, J.R., Stefanović, A.B., Tanasković, S.J., Đurović, S.B., Bugarski, B.M., Knežević-Jugović, Z.D. Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten (2017) *Industrial Crops and Products*, 109, 548-557. IF(2015)= **3,449**, ISSN 0926-6690.

Kategorija 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*, 41 (5), 41 (5), art. no. e13207. DOI: 10.1111/jfpp.13207 IF(2015) **0,894**, ISSN: 0145-8892.

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

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

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Mohamed Bashir Elmalimadi, master inženjera.

Odlukom br. 35/477 od 30.11.2017. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata **Mohamed Bashir Elmalimadi** pod naslovom

„Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima“

„Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten“

Posle pregleda dostavljene Disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa Kandidatom, Komisija je sačinila sledeći

REFERAT

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

Školske 2013/14 godine kandidat **Mohamed Bashir Elmalimadi**, master inž. upisao je doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu, Tehnološko- metalurškom fakultetu, profil Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Rešenjem rektora Univerziteta u Beogradu broj 06-61302-6053/3-13 od 02.07.2014. godine priznata je visokoškolska isprava drugog nivoa obrazovanja stečena na Univerzitetu u Misurati, Libija, izdata 03.06.2014. godine.

3.11.2016. - Kandidat **Mohamed Bashir Elmalimadi**, master inž. predložio je temu doktorske disertacije pod nazivom: **„Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima“** (**„Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten“**), a Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu usvojilo Komisiju za ocenu naučne zasnovanosti predložene teme 26.12.2016.

20.04.2017. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, na osnovu podnetog referata komisije, doneta je odluka (br. 35/90) o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije **Mohamed Bashir Elmalimadi**, master inž., pod nazivom **„Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima“** (**„Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten“**), a za mentora ove doktorske disertacije imenovana je dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta.

05.06.2017. - Na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije **Mohamed Bashir Elmalimadi**, master inž., pod nazivom **„Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog**

enzimskim postupcima“ (Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten).

30.11.2017. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka o imenovanju komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije **Mohamed Bashir Elmalimadi**, master inž., pod nazivom „**Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima“ (Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten)** (br. odluke 35/477).

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo (uža naučna oblast Biotehnologija i biohemijsko inženjerstvo) za koju je matična ustanova Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Za mentora je izabrana dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu koja je na osnovu objavljenih publikacija i iskustva kompetentna da rukovodi izradom ove doktorske disertacije.

1.3. Biografski podaci o kandidatu

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.

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

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 dva rada u međunarodnom časopisu (kategorizacije M21a jedan rad i M23 jedan rad) i sedam saopštenje na međunarodnim i nacionalnim skupovima od kojih je pet štampano u celosti, dva rada u izvodu.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija **Mohamed Bashir Elmalimadi**, master inženjera, napisana je na engleskom jeziku na 116 strana, sadrži 51 sliku, 22 jednačine, 18 tabela i 209 literaturnih navoda. Doktorska disertacija sastoji se iz sledećih poglavlja: *Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključci i Literatura*, uz izvode na srpskom i engleskom jeziku. Na početku disertacije dat je Rezime na engleskom i srpskom jeziku, a na kraju disertacije nalazi se Biografija na srpskom i engleskom jeziku i tri obavezna Priloga:

Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i Izjava o korišćenju.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U *Uvodu* dat je kratak osvrt na oblast istraživanja, definisan je predmet istraživanja i aktuelnost problematike u svetu, kao i glavni ciljevi disertacije. Data su osnovna razmatranja o značaju proteina pšeničnog glutena i hidrolizata posmatrana kroz njihova tehnološko-funkcionalna i biološka svojstva, sa osvrtom na potencijalnu primenu u različitim oblastima, naročito kao komponenta funkcionalne hrane. Navedeni su osnovni principi nekih od postupaka koji se primenjuju za poboljšanje svojstava glutena, naročito postupka enzimске hidrolize, koji je primenjen u ovoj disertaciji. Na kraju *Uvoda* predstavljeni su ciljevi rada i plan istraživanja.

Teorijskom deo se sastoji iz četiri potpoglavlja i to: 1) Osnovna svojstva proteina; 2) Enzimska hidroliza proteina; 3) Biološke aktivnosti peptida izolovanih iz pšeničnog glutena; i 4) Pregled postupaka za optimizaciju enzimске hidrolize proteina.

U potpoglavlju *Osnovna svojstva proteina* opisana su fizičko-hemijska svojstva proteina glutena i drugih prirodnih proteina od značaja za njihovu primenu u prehrambenoj industriji. Potom su detaljno opisana struktura i svojstva pojedinačnih frakcija proteina glutena i istaknut je njihov značaj. 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. Detaljno su razmatrana osnovna tehnološko-funkcionalna svojstva proteina poput rastvorljivosti, sposobnosti penjenja i emulgovanja, sposobnosti stvaranja tankog filma i kapaciteta vezivanja vode i ulja, kao i korelacija između ovih svojstava i strukture proteina. Naglašeno je da je rastvorljivost jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava, budući da protein mora biti rastvoran da bi se uspešno implementirao u različite prehrambene proizvode. Druga funkcionalna svojstva (emulgovanje, geliranje ili penivost) takođe zavise od rastvorljivosti proteina. Navedeni su neki od primenjenih postupaka i primera iz literature koji su doveli do unapređenja rastvorljivosti, emulgujućih i gelirajućih svojstava glutena.

U potpoglavlju *Enzimska hidroliza proteina* navedene su proteaze koje se koriste u ovim procesima kao i njihova klasifikacija, osnovna katalitička svojstva, specifičnost i mehanizmi delovanja. Detaljno je opisana struktura i specifičnost delovanja proteaze iz *Bacillus licheniformis* (alkalaza), koja je korišćena kao biokatalizator u okviru ove disertacije. Definisane su najčešće korišćene metode za određivanje stepena hidrolize, kao i faktori koji utiču na samu enzimsku reakciju hidrolize proteina.

U potpoglavlju *Biološke aktivnosti peptida izolovanih iz pšeničnog glutena* prikazane su neke od do sada identifikovanih i objavljenih sekvenci biološki aktivnih peptida dobijenih iz glutena. Dat je detaljan pregled ovih peptida tabelarno. 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 proteolitičkim enzimima. 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 su dimenzija. Molekulska masa i strukturne karakteristike, kao što je hidrofobnost, utiču na glavne transportne puteve kod peptida. Međutim, što je molekulska masa peptida veća, to se smanjuje njegova šansa da prođe intestinalne barijere.

U navedenom potpoglavlju opisane su neke od studija koje su sprovedene kako bi se utvrdilo antioksidativno dejstvo hidrolizata ili bioaktivnih peptida iz glutena, ali i drugih prirodnih proteina. Tačan mehanizam antioksidativne aktivnosti peptida 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 potpoglavlju *Pregled postupaka za optimizaciju enzimske hidrolize proteina* navedene su prednosti enzimske hidrolize u poređenju sa mikrobiološkim i hemijskim postupcima za unapređenje funkcionalnih i bioloških svojstava pšeničnog glutena poput blagih reakcionih uslova, smanjenog obrazovanja sporednih proizvoda i dobijanja neobojenih hidrolizata boljeg kvaliteta, ali i nedostaci zbog kojih je primena ovih postupaka još uvek ograničena u većim razmerama. 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. Kontrolisanom i parcijalnom hidrolizom proteina mogu se unaprediti njihova fizičko-hemijska svojstva, smanjiti alergenost, ali i osloboditi bioaktivni peptidi koji im dodeljuju dodatna svojstva funkcionalne hrane. 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 i bioloških svojstava. Pored toga, dobijeni hidrolizati često imaju gorak i neprijatan ukus, a mogu da zadrže i alergenost nakon procesa. Zbog toga, u ovom potpoglavlju opisani su postupci za optimizaciju parametara enzimskog procesa poput metodologije odzivnih površina sa aspekta različitih izlaznih veličina i dati su odabrani parametri i eksperimentalni modeli koji su najčešće korišćeni za optimizaciju ovih procesa.

U poglavlju *Materijali i metode* navedeni su materijali i oprema korišćeni u toku izrade ove disertacije, a zatim su navedene metode korišćene u toku eksperimentalnog rada i obrade rezultata. Prvo su opisani uslovi procesiranja proteina glutena toplotnim tretmanom kao i načini izvođenja enzimske reakcije hidrolize proteazom iz *Bacillus licheniformis* (alkalaza). Detaljno su opisani konfiguracija bioreaktora u kojima je izvršena reakcija kao i tipovi mehaničkih mešalica i način mešanja. Detaljno su opisane i procedure za određivanje funkcionalnih svojstava proteina

glutena pre i posle tretmana i to: 1) postupci određivanja indeksa aktivnosti i stabilnosti emulzije; 2) postupci određivanja kapaciteta i stabilnosti pene; 3) postupci određivanja rastvorljivosti proteina pri različitim pH vrednostima; 4) postupci za određivanje kapaciteta vezivanja ulja; i 5) postupci za određivanje kapaciteta vezivanja vode. Detaljno su opisane i tehnike membranske separacije za razdvajanje hidrolizata proteina na frakcije na osnovu veličine molekula, kao i metode određivanja veličine proteinskih frakcija (SDS - PAGE elektroforezom). S obzirom da je jedan od osnovnih ciljeva izrade ove doktorske disertacije bio izolovanje i karakterizacija bioaktivnih peptida iz složene smeše proteina glutena, od izuzetne važnosti bilo je testiranje bioloških aktivnosti *in vitro* metodama. Stoga, u ovom poglavlju opisani su postupci za određivanje antioksidativne aktivnosti hidrolizata i/ili frakcija peptida i to: 1) sposobnost neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH); 2) sposobnost neutralizacije radikalskog katjona 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS); 3) metoda inhibicije superoksid radikala i 4) sposobnosti heliranja jona metala.

Poglavlje *Rezultati i diskusija* obuhvata prikaz rezultata dobijenih u eksperimentalnom radu pri izradi ove disertacije, njihovu analizu i diskusiju koja uključuje poređenje sa rezultatima dobijenim u radovima iz literature u sličnim ispitanim sistemima. U ovom poglavlju nalazi se ukupno 6 potpoglavlja i to: 1) Uticaj toplotnog pretretmana na enzimsku hidrolizu pšeničnog glutena; 2) Uticaj procesnih parametara na kinetiku enzimske hidrolize glutena i stepen hidrolize; 3) Uticaj geometrije mešalice i načina mešanja na kinetiku enzimske hidrolize glutena i stepen hidrolize; 4) Optimizacija procesnih parametara sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava pšeničnog glutena primenom eksperimentalnih planova; 5) Optimizacija procesnih parametara sa aspekta antioksidativne aktivnosti hidrolizata primenom eksperimentalnih planova; 6) Izolovanje biološki aktivnih peptida membranskom separacijom i njihova karakterizacija.

U prvom potpoglavlju dati su rezultati uticaja toplotnog tretmana na kinetiku i stepen hidrolize glutena alkalazom. Pokazano je da termički pretretman (zagrevanje disperzije glutena na 75 °C u toku 30 minuta) značajno ubrzava reakciju i utiče na ravnotežni stepen hidrolize. Kako je potvrđeno na osnovu povećanja sadržaja reaktivnih sulfhidrilnih grupa i smanjenja udela α -heliksa u sekundarnoj strukturi da dolazi do promena u strukturi molekula glijadina i glutenina nakon termičkog tretmana, verovatno da se pod uticajem toplote razmotava molekul proteina i oslobađaju unutrašnje peptidne veze koje postaju dostupne dejstvu alkalaze. Samim tim, postižu se veći ravnotežni stepeni hidrolize sa pretretiranim glutenom pri istim reakcionim uslovima i oni dostižu vrednost i do 30,2% pri pH 8, 60 °C, i odnosu enzim-supstrat od 0,5 AU/g, što je značajno više od sličnih istraživanja u literaturi. Međutim, veći stepeni hidrolize nisu bili u korelaciji sa tehnološko-funkcionalnim svojstvima poput rastvorljivosti, kapaciteta pene, stabilnosti pene, emulgirućih svojstava kao ni kapaciteta vezivanja vode i ulja.

U potpoglavlju *Uticaj procesnih parametara na kinetiku enzimske hidrolize glutena i stepen hidrolize* prikazani su kinetički rezultati hidrolize glutena alkalazom pri različitim temperaturama, pH vrednostima, početnim koncentracijama glutena i odnosima enzim/supstrat. Uočeno je različito kinetičko ponašanje u sistemu pri niskim i visokim koncentracijama glutena. Naime, pri niskim koncentracijama od 1-5% reakcija se pokorava klasičnoj Mihaelis-Mentenovoj kinetici, dok pri koncentracijama glutena većim od 9%, dolazi do pada brzine reakcije, što se može pripisati inhibicijom enzima supstratom u višku, maloj rastvorljivosti glutena, difuzionim limitacijama ili istovremenom uticaju više navedenih faktora. Najviši stepeni hidrolize su postignuti pri najmanjim početnim koncentracijama glutena i višim pH vrednostima.

Kako su postignuti veći stepeni hidrolize samo pri niskim koncentracijama glutena, u daljem radu pokušalo se da se pravilnim izborom načina mešanja i geometrije mešalice, kao i

podešavanjem brzine mešanja, unapredi prenos mase i toplote u ovom disperznom sistemu i omogući 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 mogućnosti postizanja većih prostorno-vremenskih prinosa reaktora. Međutim, pri većim koncentracijama, gluten gradi grubo disperzne sisteme u vodi usled formiranja agregata, što može biti razlog nehomogene distribucije enzima u sistemu kao i otežane kontrole temperature i pH vrednosti, zbog čega opada brzina reakcije. Pokazano je da je geometrija mešalice od krucijalne važnosti za efikasno odvijanje enzimske reakcije. Ispitano je nekoliko geometrija mešalica i to mešalice sa zakošenim lopaticama, sidrasta mešalice, helikoidalna mešalice i druge na početnu brzinu reakcije i ravnotežni stepen hidrolize. Iako se na osnovu uvida u literaturu, helikoidalna i sidrasta mešalice velikog prečnika (90 i 94% od unutrašnjeg prečnika suda) uspešno koriste za efikasno mešanje i odvijanje enzimskih reakcija u viskoznim sistemima jer ne prouzrokuju jake sile smicanja koje bi deaktivirale enzim i unapređuju mešanje u ovim sistemima, najveće početne brzine enzimske hidrolize glutena su postignute sa mešalicom sa četiri zakošene lopatice (DH 30,47%, 105 min). Kod ovih mešalica mešanje se manifestuje aksijalnim strujanjem na dole, sa pojačanim smicanjem, koje ne prouzrokuje deaktivaciju enzima u toku 2 h reakcije uz intenzivno mešanje. Ispitan je i uticaj brzine mešanja u intervalu od 100 do 750 rpm na brzinu reakcije i utvrđeno je da u intervalu do 350 rpm sa porastom brzine mešanja raste i brzina reakcije, što se može objasniti smanjenim difuzionim limitacijama. Pokazano je da je jedan od potencijalnih razloga i smanjenje prečnika agregata, usled čega se povećava granična površina za odvijanje enzimske reakcije kao i adsorpcija enzima na agregiranim česticama glutena. Međutim, pri povećanju brzine mešanja u intervalu od 350 do 750 rpm, dolazi do naglog pada brzine reakcije verovatno usled deaktivacije enzima smicajnim silama.

U potpoglavlju *Optimizacija procesnih parametara sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava pšeničnog glutena primenom eksperimentalnih planova* ispitan je uticaj četiri procesna parametra na četiri odabrana svojstva hidrolizata primenom Box-Behnken-ovog eksperimentalnog plana. Konkretno, ispitan su uticaji koncentracije supstrata, odnosa $[E]/[S]$, pH i temperature na stepen hidrolize, rastvorljivost, emulgujuću aktivnost i stabilnost, te kapacitet i stabilnost pene pomoću eksperimentalnog dizajna. Metoda odzivne površine je korišćena da se proceni značaj svakog pojedinačnog faktora uzimajući u obzir njihove interakcije, kao i da se utvrde optimalni uslovi hidrolize glutena katalizovane alkalazom iz *B. licheniformis*. Najveća rastvorljivost hidrolizata (~ 97% i ~ 92%) postiže se pri niskim koncentracijama supstrata (1%) i niskim odnosima $[E]/[S]$ (0,5 i 0,25 AU/g glutena, redom). Prikazani rezultati verifikovani su za najnižu temperaturu reakcije i najvišu pH vrednost reakcije. Dobijeni rezultati mogu se objasniti velikom afinitetom alkalaze prema glutenu i mogućnošću izvođenja hidrolize ovom endopeptidazom obrazujući veliku količinu rastvorljivih peptida. Sposobnost emulgovanja hidrolizata je povezna sa stepenom hidrolize, pri čemu niži stepen hidrolize dovodi do veće emulgujuće aktivnosti. Uopšteno je prihvaćeno da limitirana hidroliza poboljšava emulgujuća svojstva proteina i njihovih hidrolizata. Najveća emulgujuća aktivnost hidrolizata proteina glutena od 2782,9 m²/g se postiže pri slabo baznoj sredini od 8,01 i temperaturi reakcije od 47,5 °C. Što se tiče emulgujuće stabilnosti hidrolizata proteina, uzimajući u obzir sve značajne faktore prilikom određivanja maksimalne emulgujuće stabilnosti, dolazi se do zaključka da se ista postiže pri $[E]/[S]$ odnosu od 0,75 AU/g glutena i koncentraciji supstrata od 9,0%.

U potpoglavlju *Optimizacija procesnih parametara sa aspekta antioksidativne aktivnosti hidrolizata primenom eksperimentalnih planova* ispitane su antioksidativne aktivnosti hidrolizata glutena dobijenih pri različitim uslovima. Konkretno, ispitani su uticaji četiri procesna parametara na antioksidativnu aktivnost hidrolizata primenom Box-Behnken-ovog eksperimentalnog plana, a analiziranje rezultata izvršeno je metodom odzivnih površina. Varirani su koncentracija bakterijske proteaze, koncentracija supstrata, pH i temperatura, dok su rezultati antioksidativne aktivnosti pripremljenih hidrolizata određene na osnovu sposobnosti inhibicije DPPH i ABTS radikala. Najveća vrednost stepena neutralizacije/inhibicije DPPH radikala (~ 94 %) izmerena je za hidrolizat dobijen pri visokoj koncentraciji suptrata (9%), umerenoj temperature reakcije (50 °C) i neutralnoj pH vrednosti 7, kao i pri srednjoj vrednosti $[E]/[S]$ odnosa (0,5 AU/g glutena). Pokušano je da se uspostavi korelacija između stepena hidrolize i sposobnosti inhibicije DPPH radikala i utvrđeno je da sa porastom stepena hidrolize do oko 15% povećava se i DPPH antioksidativna aktivnost, da bi pri većim stepenima hidrolize naglo opala. Sposobnost inhibicije katjenskog ABTS radikala nije bila u korelaciji ni sa DPPH inhibitornom aktivnosti, kao ni sa stepenom hidrolize. Ovi rezultati su pokazali da nije moguće primenom istih reakcionih uslova istovremeno postići i visok stepen hidrolize (veliki prinos peptida), maksimalnu DPPH i ABTS inhibitornu aktivnost kao i da je zadržavanje određenih delova sekundarne strukture, koja se nalazi u dužim oligopeptidima, neophodno za antioksidativnu aktivnost.

U potpoglavlju *Izolovanje biološki aktivnih peptida membranskom separacijom i njihova karakterizacija* odabrani hidrolizati, koji su pokazali veliku antioksidativnu aktivnost, koncentrovani su i razdvajani po veličini na četiri frakcije pomoću ultrafiltracije sa tri membrane različitih veličina pora (30 kDa, 10 kDa, 3kDa), a potom na više frakcija primenom gel permeacione hromatografije. Antioksidativna aktivnost ultrafiltracionih frakcija hidrolizata glutena određena je na osnovu sposobnosti neutralizacije 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)-diamonijum so (ABTS) radikala, superoksid radikala kao i sposobnosti heliranja jona metala. Ispitivanjem antioksidativnih osobina svih uzoraka pomoću četiri različite metode, došlo se do zaključka da frakcije proteina glutena manje molekulske mase pokazuju bolju sposobnost u borbi protiv slobodnih radikala, ali i da njihova učinkovitost zavisi od uslova odvijanja samog procesa hidrolize. Naime, peptidi iste ili slične molekulske mase izolovani iz hidrolizata dobijenih pri različitim uslovima pokazali su značajno različitu antioksidativnu aktivnost određenu pomoću iste metode, što ukazuje da sekvenca peptida kao i udeo zadržane sekundarne strukture imaju značajnu ulogu. Generalno je pokazano da frakcije glutenina i glijadina poseduju specifične sekvence aminokiselina koje kada se oslobode iz kompleksne strukture nativnog proteina postaju veoma vredan izvor antioksidanasa.

U poglavlju *Zaključci* jasno i pregledno su izneti zaključci izvedeni na osnovu rezultata predstavljenih u prethodnim poglavljima koji su u saglasnosti sa postavljenim ciljevima rada.

U poglavlju *Literatura* dat je spisak korišćene literature.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Enzimaska hidroliza proteina različitim proteazama kao i primena različitih pretretmana svakako nije nov problem i u literaturi postoji veliki broj radova i patenata koji razmatraju ovu tematiku. Međutim, malo se radova odnosi na pšenični gluten i oni su uglavnom usmereni na primenu različitih enzimskih i drugih postupaka u cilju smanjenja alergenskog potencijala glutena. U ovoj tezi se proučava enzimaska hidroliza sa aspekta izolovanja i dobijanja bioaktivnih peptida. Iako su nedavna istraživanja pokazala da pšenični gluten i njegovi hidrolizati imaju veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa proteinima kukuruza ili graška, što su autori doveli u vezu sa značajno većim sadržajem disulfidnih veza (45,37 nmol/mg) i ukupnog cisteina (93,88 nmol/mg) u poređenju sa drugim proteinima, veoma malo se zna o proizvodnji antioksidativnih peptida iz pšeničnog glutena kao i uticaju operativnih uslova na stepen hidrolize i antioksidativnu aktivnost hidrolizata. U ovom radu korišćene su četiri metode za određivanje antioksidativne aktivnosti hidrolizata glutena i njihovih frakcija i to: sposobnost inhibicije DPPH radikala, ABTS radikala, superoksid radikala i sposobnost heliranja metalnih jona. Sve ove metode poseduju određene specifičnosti, odnosno drugim rečima, biološki aktivni peptidi će reagovati drugačijim mehanizmom i intezitetom, pa samim tim isti proteini neće pokazivati isti stepen antioksidativne aktivnosti kada se testiraju različitim metodama. Ovo je važno jer prilikom ispitivanja antioksidativnih svojstava određenog jedinjenja treba koristiti što više metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti jer će se na taj način dobiti najpotpunija slika realne sposobnosti određenog jedinjenja, u ovom slučaju peptida, da deluju kao antioksidansi i sprečavaju neželjene reakcije slobodnih radikala u organizmu.

Ova teza doprinesi razumevanju uticaja termičkog pretretmana i procesnih parametara pri izvođenju enzimske hidrolize pšeničnog glutena na tehnološko-funkcionalna i biološka svojstva dobijenih hidrolizata. Uspostavljena je i korelacija između stepena hidrolize i određenog funkcionalnog svojstva poput rastvorljivosti, indeksa emulgujuće aktivnosti i stabilnosti, kapaciteta i stabilnosti pene kao i antioksidativne aktivnosti hidrolizata. Pokazano je da u nekim slučajevima intenzivna hidroliza može čak dovesti do neželjenih efekata i pogoršanja određenog svojstva hidrolizata, ali i da hidrolizati sa približno istim vrednostima stepena hidrolize dobijeni pri različitim procesnim uslovima imaju drugačiji profil peptida i drugačija funkcionalna svojstva. Zbog toga, u tezi je primenom eksperimentalnih planova i metodologije odzivnih površina izvršena pažljiva optimizacija nekoliko procesnih parametara, pri čemu su razmatrana različita funkcionalna i antioksidativna svojstva kao izlazne veličina. Dobijene su matematičke funkcije sa definisanim maksimumima koje adekvatno opisuju uticaj temperature, pH, koncentracije glutena i enzima na svako od navedenih svojstava i ukazuju na međusobni uticaj i interakcije između procesnih parametara.

Teza doprinosi i razumevanju uticaja geometrije mešalice i načina mešanja na brzinu enzimske hidrolize glutena. 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 enzimsku hidrolizu proteina. U slučaju odvijanja reakcije u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem, obično dolazi do nekoliko problema poput inhibicije enzima proizvodima reakcije ili supstratom u višku, 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 disperzni 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. 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 mogućnosti postizanja većih prostorno-vremenskih prinosa reaktora. U tezi je pokazano da se pravilnim izborom mehaničke mešalice i brzine mešanja mogu postići veći stepeni hidrolize za relativno kratko vreme i pri većim početnim koncentracijama glutena, što je od važnosti za praktičnu primenu.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

Tokom izrade doktorske disertacije kandidat je izvršio detaljan pregled naučne i stručne literature iz relevantnih naučnih oblasti vezanih za problematiku doktorske disertacije.

Citirana su 209 literaturna navoda koja su omogućila da se jasno predstavi stanje u ispitivanoj naučnoj oblasti, kao i da se sagleda aktuelnost problematike. Većinu pregledane literature čine radovi publikovani u vrhunskim međunarodnim časopisima od strane eminentnih stručnjaka u ispitivanoj naučnoj oblasti. Na osnovu ovog preseka stanja u literaturi izložene su osnovne smernice za istraživanja koja su sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji. Iz obrazloženja predložene teme doktorske disertacije i objavljenih radova u prijavi, koju je kandidat podneo, kao i iz popisa literature koja je korišćena u istraživanju, uočava se adekvatno poznavanje predmetne oblasti istraživanja, kao i poznavanje aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

U prijavi doktorske disertacije su postavljeni zadaci koji su ostvareni korišćenjem odgovarajućih eksperimentalnih tehnika i savremenih instrumentalnih metoda prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature, kao i adekvatnom analizom i obradom podataka.

Promene u strukturi glutena nakon termičkog pretretmana praćene su pomoću Ramanove i FTIR spektroskopije. Kao kontrolni uzorak korišćen je osušeni netretirani vodeni rastvor pšeničnog glutena. 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 ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$). Površinska hidrofobnost termički pretretiranih proteina određena je spektrofotometrijski pomoću sprektrofluorimetra (Horiba FluoroMax 4) prema modifikovanoj metodi iz literature.

Enzimska reakcija hidrolize termički pretretiranog i nativnog glutena izvedena je u šaržnom reaktoru sa automatskom kontrolom temperature $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i vrednosti pH $\pm 0,1$ uz mehaničko mešanje sa mešalicama različite geometrije i ostale hidrodinamičke uslove. U radu su ispitani uticaji 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. Napredovanje i tok enzimske reakcije praćen je 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 pH vrednosti. Količina oslobođenih α -amino grupa je verifikovana i primenom spektrofotometrijske metode i to sa 2,4,6-trinitrobenzensulfonskom kiselinom (TNBS). Sva ispitivanja izvedena su prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature.

Od tehnološko-funkcionalnih svojstava pretretiranih proteina i hidrolizata razmatrani su: kapacitet i stabilnost pene, emulgaciona svojstva, rastvorljivost pri različitim pH vrednosti,

kapacitet vezivanja vode i ulja. Rastvorljivost hidrolizata glutena određena je spektrofotometrijski. Razblaženi uzorci (10% v/v) su centrifugirani pri jako velikom broju obrtaja (15 minuta, 14,900 g na 4°C) da bi se staložili nerastvorni proteini. Posle toga, analiziran je sadržaj proteina u supernatantu i početnom uzorku standardnom metodom po Loriju i na osnovu određenih odnosa izračunava se rastvorljivost proteina.

Kapacitet i stabilnost pene pretretiranih proteina i njihovih hidrolizata određena je 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 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 određena su spektrofotometrijskom metodom i izražena su kao indeks emulgacione aktivnosti i emulgacione stabilnosti.

Distribucija molekulske mase hidrolizata glutena određena je metodom SDS-PAGE elektroforeze u jedinici za vertikalnu elektroforezu (Hoefer Ruby vertical system; GE Healthcare Life Sciences, USA) kao i preparativne gel permeacione hromatografije. Izolovanje i prečišćavanje frakcije peptida izvršeno je korišćenjem ultrafiltracione jedinice (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) i odgovarajućih membrana izrađenih od regenerisane celuloze različitih veličina pora, kao i preparativnom gel permeacionom hromatografijom primenom kolona za čije punjenje je korišćena suspenzija Toyopearl HW-40F (metakrilni polimer sa uvedenim hidroksilnim grupama koji služi za razdvajanje biomolekula u opsegu molekulskih masa 10-0,1 kDa).

Antioksidativna aktivnost hidrolizata i/ili frakcija peptida ispitana je 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^{•-}) i
- heliraju metalne jone (jone gvožđa),

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 antioksidanasa su međusobno upoređene, ali i sa komercijalnim sintetičkim antioksidativnim sredstvima.

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

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.

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 svojstva (emulgovanje, kapacitet vezivanja vode i ulja, penivost) takođe zavise od rastvorljivosti proteina. Pобољшanje rastvorljivosti, emulgujućih i drugih funkcionalnih svojstava glutena doprinosi povećanju lepeze proizvoda u koje se ovi proteini mogu dodavati kao emulgatori ili bioaktivni agensi. U ovoj tezi pokazano je da se parcijalnom enzimskom hidrolizom glutena u kontrolisanim uslovima mogu značajno unaprediti funkcionalna i biološka svojstva ovog proteina i valorizovati njegova primena u prehrambenoj industriji.

Jedan od ciljeva ove disertacije bio je i 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 alergenost, ali i osloboditi bioaktivni peptidi koji im dodeljuju dodatna svojstva funkcionalne hrane. Na osnovu pregleda do sada objavljenih eksperimentalnih podataka i rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije, može se zaključiti da je ostvaren značajan doprinos u mogućnosti implementacije enzimске hidrolize termički pretretiranog glutena alkalazom za dobijanje hidrolizata sa antioksidativnom aktivnosti verifikovanom pomoću nekoliko metoda. Rezultati dobijeni u toku rada na ovoj doktorskoj disertaciji daju značajan naučni doprinos i objašnjenju mehanizama antioksidativnog delovanja pojedinih frakcija peptida kao i uvide u korelaciju između intenziteta hidrolize (stepena hidrolize) i antioksidativne aktivnosti.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Glavni naučni doprinos ove doktorske disertacije predstavlja razvoj inovativnog biotehnološkog postupka koji se zasniva na kombinovanoj primeni termičkog pretretmana i parcijalne enzimске hidrolize alkalazom za dobijanje hidrolizata pšeničnog glutena određenih tehnološko-funkcionalnih i antioksidativnih svojstava, koji podrazumeva nekoliko pojedinačnih doprinosa:

- Nova saznanja o mogućnosti primene enzimске hidrolize za pobољшanje tehnološko-funkcionalnih i antioksidativnih svojstava pšeničnog proteina nasuprot konvencionalnih hemijskih postupaka;
- Definisani su optimalni procesni parametri i način izvođenja toplotnog pretretmana glutena sa aspekta strukture i tehnološko-funkcionalnih svojstava tretiranih proteina;
- Utvrđen je uticaj geometrije nekoliko mešalica i brzine mešanja na brzinu enzimске reakcije i stepen hidrolize koji je omogućio dizajn efikasnog procesa pri većim početnim koncentracijama glutena;
- Definisani su optimalni procesni parametri za odvijanje enzimске hidrolize pšeničnog glutena proteazom iz *B. licheniformis* (alkalazom) sa aspekta stepena hidrolize, rastvorljivosti, indeksa emulgujuće aktivnosti i stabilnosti, kapaciteta i stabilnosti pene. Uspostavljena je korelacija između stepena hidrolize i navedenih tehnološko-funkcionalnih svojstava;
- Definisani su optimalni procesni parametri za odvijanje enzimске hidrolize pšeničnog glutena alkalazom sa aspekta antioksidativne aktivnosti dobijenih hidrolizata. Utvrđena je korelacija između stepena hidrolize i antioksidativnih svojstava hidrolizata određenih pomoću DPPH i ABTS metode;

- Utvrđena je kinetika enzimske reakcije hidrolize glutena u cilju dobijanja projektnih jednačina neophodnih za projektovanje i dizajn šaržnog enzimskog reaktora za proizvodnju hidrolizata glutena;
- Izolovano je nekoliko biološki aktivnih frakcija peptida iz odabranih hidrolizata glutena primenom membranskih separacionih tehnika i preparativne gel permeacione hromatografije, koji su okarakterisani i čija je antioksidativna aktivnost verifikovana na osnovu četiri metode poput sposobnosti inhibicije DPPH radikala, ABTS katjonskog radikala, superoksid radikala i sposobnosti heliranja jona metala;
- Utvrđena je korelacija između strukture i dužine sekvence peptida izolovanih iz hidrolizata proteina glutena i antioksidativne aktivnosti određene pomoću različitih metoda na osnovu čega su dobijeni uvidi u mehanizam antioksidativnog delovanja ovih peptida.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Pregledom dostupne literature iz ove oblasti istraživanja koja razmatra enzimske procese za dobijanje hidrolizata pšeničnog glutena kao komponenata funkcionalne hrane, kao i razmatranjem rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji, uočava se da rezultati iz ove doktorske disertacije značajno dopunjuju postojeća saznanja iz pomenute oblasti. Naime, optimizacijom ključnih procesnih faktora i načina i intenziteta mešanja, značajno su unapređena tehnološko-funkcionalna svojstva ovih proteina, a ujedno i povećana efikasnost enzimske hidrolize. Razvojem efikasnog enzimskog postupka u šaržnom reaktorskom sistemu sa poboljšanim mehaničkim mešanjem i membranskih separacionih procesa, kao i uspostavljanjem odgovarajućeg kinetičkog modela, postavljeni su osnovi za uvećanje razmera procesa dobijanja hidrolizata pšeničnog glutena sa tačno definisanim funkcionalnim svojstvima kao i pojedinih frakcija peptida sa definisanom antioksidativnom aktivnosti.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Mohamed Bashir Elmalimadi je rezultate istraživanja dobijene u okviru izrade svoje doktorske disertacije potvrdio objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog značaja i saopštenjima na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Rezultati istraživanja proistekli iz ove disertacije objavljeni su do sada u okviru dva rada u naučnim časopisima međunarodnog značaja (kategorizacije M21a-jedan rad, M23-jedan rad) i četiri saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima od kojih su svi štampani u celini. Kandidat se tokom izrade disertacije bavio istraživačkim radom u okviru uže naučne oblasti biohemijskog inženjerstva i biotehnologije u okviru kojih je koautor još tri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja - M20

- Rad u međunarodnom časopisu - M21a

1. **Elmalimadi, M.B.**, Jovanović, J.R., Stefanović, A.B., Tanasković, S.J., Đurović, S.B., Bugarski, B.M., Knežević-Jugović, Z.D. Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten (2017) *Industrial Crops and Products*, 109, 548-557. IF(2015)= 3,449, ISSN 0926-6690.

- 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*, 41 (5), 41 (5), art. no. e13207. DOI: 10.1111/jfpp.13207 IF(2015) **0,894**, ISSN: 0145-8892.

Zbornici međunarodnih naučnih skupova - M30

1. 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., 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

- Saopštenja sa nacionalnog skupa štampana u celini – M63

1. 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

Ostali naučni radovi kandidata

- Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini - M33

1. **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.

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu prethodno iznetih razmatranja rezultata doktorske disertacije Mohamed Bashir Elmalimadi, master inž. pod nazivom „**Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima**“ (**Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten**) smatramo da su ispunjeni svi ciljevi i zadaci rada na ovoj tezi i da ona svojim sadržajem i kvalitetom značajno doprinosi oblasti Tehnološko inženjerstvo, što je i potvrđeno objavljivanjem radova u međunarodnim časopisima, kao i publikovanjem rezultata na konferencijama od međunarodnog i nacionalnog značaja. Takođe, komisija je mišljenja da je kandidat ispoljio izuzetnu naučnoistraživačku sposobnost u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da se doktorska disertacija pod nazivom „**Funkcionalna i biološka svojstva pšeničnog glutena modifikovanog enzimskim postupcima**“ (**Functional and biological properties of enzymatically modified wheat gluten**) kandidata Mohamed Bashir Elmalimadi prihvati, izloži na uvid javnosti i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu. Takođe, da se nakon završetka ove procedure, kandidat pozove na usmenu odbranu doktorske disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

ČLANOVI KOMISIJE

Prof. dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Prof. dr Branko Bugarski, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Prof. dr Marica Rakin, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Prof.dr Mirjana Antov, redovni profesor,
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet