

Образац 3.

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/57

(Број захтева)

Веће научних области техничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

19.04.2021.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације
и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета",
број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске
дисертације:

Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и
побољшања функционалних својстава

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Ивана (Владан)Газикаловић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Мастер студије, Мастер инжењер технологије

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2016.

4. Година уписа на докторске студије: 2016.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијко инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др Зорица Кнежевић-Југовић

Звање: Редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Đurović, S., Nikolić, B., Luković, N., Jovanović, J., Stefanović, A., Šekuljica, N., Mijin, D., **Knežević-Jugović, Z.**, The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds (2018) *Industrial Crops and Products*, 122, pp. 223-231. ISSN: 0926-6690; IF (2017) 3,849.
2. Salim, A.A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., **Knežević-Jugović, Z.** 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 (2017) *Bioresource Technology*, 228, pp. 193-200. ISSN: 0960-8524; IF(2017) 5,807.
3. **Knežević-Jugović, Z.D.**, Žuža, M.G., Jakovetić, S.M., Stefanović, A.B., Džunuzović, E.S., Jeremić, K.B., Jovanović, S.M. An approach for the improved immobilization of penicillin G acylase onto macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) as a potential industrial biocatalyst (2016) *Biotechnology Progress*, 32 (1), pp. 43-53. ISSN: 8756-7938; IF(2015) 2,167.
4. Perović, M.N., **Knežević Jugović, Z.D.**, Antov, M.G. Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction (2020) *Journal of Food Engineering*, 276, art. no. 109894. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109894; IF(2019)4,499; ISSN: 0260-8774.
5. Tanasković, S.J., Šekuljica, N., Jovanović, J., Gazikalović, I., Grbavčić, S., Đorđević, N., Sekulić, M.V., Hao, J., Luković, N., **Knežević-Jugović, Z.** Upgrading of valuable food component contents and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition (2021) *Journal of Cereal Science*, 99, art. no. 103159. ISSN 0733-5210; IF(2019) 2,938.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф.дрПетарУскоковћ

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл. 43. Правилника о докторским студијама ТМФ-а на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 11.03.2021. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **Иване Газикаловић**, број индекса 4016/2016, под називом: „**Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава**“.

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За ментора се одређује др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Одлуку доставити: Универзитету у Београду, кандидату, ментору, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

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

Predmet: Podobnost teme i kandidata **Ivane Gazikalović, master inženjera tehnologije**, za izradu doktorske disertacije.

Odlukom broj 35/20 od 04.02.2021. imenovani smo za članove Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata **Ivane (Vladan) Gazikalović** za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme pod nazivom:

„Enzimaska modifikacija pšeničnog glutena u cilju smanjenja njegove alergnosti i poboljšanja funkcionalnih svojstava“

Na osnovu materijala priloženog uz Zahtev kandidata, Komisija podnosi sledeći

REFERAT

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografski podaci

Ivana (Vladan) Gazikalović, master inženjer tehnologije, rođena je 21.06.1992. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Prvu beogradsku gimnaziju. Školske 2011/12 je upisala osnovne studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Diplomirala je 2015. godine odbranom završnog rada na temu „Uticaj različitih predtretmana na funkcionalna i senzorna svojstva hidrolizata proteina belanceta“ i potom je upisala master studije školske 2015/16, takođe na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Master studije je završila odbranom master rada na temu „Uticaj fermentacionih uslova na proizvodnju mananaze iz *Bacillus* sp.“ 2016. godine. Školske 2016/17. je upisala doktorske studije na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, pod mentorstvom prof. dr Zorice Knežević-Jugović. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija, uključujući i Završni ispit sa ocenom 10 (deset). Dobitnica je priznanja "Panta S. Tutundžić" za ostvarene odlične rezultate na osnovnim studijama. Takođe, bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u periodu od 2017-2018. godine. Od juna 2018. godine zaposlena je na Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta u zvanju istraživač pripravnik (datum izbora u zvanje: 31.05.2018.) na projektu „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ (III 46010). Govori engleski, francuski i švedski jezik.

1.2. Stečeno naučnoistraživačko iskustvo

Ivana V. Gazikalović je školske 2016/2017 upisala doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,73 (devet i 73/100) i završni ispit je takođe odbranila sa ocenom 10.

Redni broj	Naziv predmeta	Ocena	ESPB
1	Odabrana poglavlja biohemije-vitamini	10	5
2	Hemijska kinetika	10	5
3	Industrijska mikrobiologija	8	5
4	Biohemijska kinetika	10	5
5	Odabrana poglavlja matematičke analize	10	5
6	Bioaktivne materije u kozmetičkim proizvodima	10	4
7	Analogije fenomena prenosa	9	5
8	Sanitarna mikrobiologija	10	4
9	Strukturna analiza organskih molekula	10	6
10	Imobilisani biokatalizatori: tehnike imobilizacije, bioreaktori i primena	10	6
11	Engleski jezik	10	/
12	Završni ispit	10	30
Prosečna ocena/Zbir bodova		9,73	80

U toku doktorskih studija angažovana je u okviru projekta: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III 46010 od 2017. Godine, čiji je rukovodilac bila prof. dr Zorica Knežević-Jugović, prvo kao stipendista-doktorand Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a potom od 2018. kao istraživač-pripravnik u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu.

U svom dosadašnjem radu objavila je kao autor ili koautor dva rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), tri saopštenja na međunarodnim skupovima - od kojih jedno saopštenje štampano u celini (M33) i dva saopštenja štampana u izvodu (M34), jedan rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51), jedno saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64), jedno novo tehničko rešenje primenjeno na međunarodnom nivou (M81) i jedan prijavljeni domaći patent (M87). Svi publikovani radovi su proizašli kao rezultat angažovanja kandidata u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Školske 2018/2019 angažovana je na izvođenju eksperimentalnih vežbi na osnovnim akademskim studijama na predmetu Biotehnološki praktikum I, školske 2019/2020 i 2020/2021 angažovana je na eksperimentalnim vežbama na predmetu Biotehnološki praktikum II. Tokom svog angažovanja učestvovala je i u izvođenju i izradi ukupno 13 završnih i master radova studenata.

Spisak objavljenih naučnih i stručnih radova

1. Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20)

1.1. Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. N.Ž. Šekuljica, J.R. Jovanović, S.M. Jakovetić Tanasković, N.D. Ognjanović, **I.V. Gazikalović**, Z.D. Knežević Jugović, D.Ž. Mijin, Immobilization of horseradish peroxidase onto Purolite® A109 and its anthraquinone dye biodegradation and detoxification potential, *Biotechnology Progress*, **36** (2020) e2991, 10.1002/btpr.2991,

2020. ISSN 8756-7938; IF(2019) 2,334; rang časopisa 87/156 Biotechnology&Applied Microbiology.

2. S. Jakovetić Tanasković, N. Šekuljica, J. Jovanović, **I. Gazikalović**, S. Grbavčić, N. Đorđević, M. Vukašinović Sekulić, J. Hao, N. Luković, Z. Knežević-Jugović, Upgrading of valuable food component contents and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition, *Journal of Cereal Science*, 103159, (2020) *article in press*, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103159>, Dec2020. ISSN: 0733-5210; IF(2019) 2,938; rang časopisa 43/139 Food Science & Technology.

2. Zbornici međunarodnih naučnih skupova (M30)

2.1. Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)

1. Jovanovic, J., Stefanovic, A., Šekuljica, N., **Gazikalovic, I.**, Lukovic, N., Jakovetic, Tanaskovic, S., Knežević- Jugovic, Z.: Modification of emulsifying properties and metal-ion chelating ability of gluten hydrolysates by partial enzymatic hydrolysis, Editors: Markoš, J., Mihal, M., In 46th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia, May 20-23, 2019., ISBN:978-80-8208-011-0.

2.2. Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. **I. Gazikalović**, J. Jovanović, N. Šekuljica, N. Luković, S. Jakovetić Tanasković, Z. Knežević-Jugović, Optimization of submerged fermentation conditions for gluten-degrading enzyme production using *Bacillus subtilis* isolate, Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - NUTRICON 2020, Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - NUTRICON 2020, Book of Abstracts, Vladimir Kakurinov (editor), pp. 85 - 85, 978-608-4565-14-7, Ohrid, Macedonia, 2. - 4. Sep, 2020.
2. J. Jovanović, S. Jakovetić Tanasković, N. Šekuljica, **I. Gazikalović**, A. Stefanović, S. Grbavčić, N. Luković, Z. Knežević-Jugović, Extraction of phenolic compounds from agro-industrial wastes and evaluation of their antioxidative potential, Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - NUTRICON 2020, Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - NUTRICON 2020, Book of Abstracts, Vladimir Kakurinov (editor), pp. 123 - 123, 978-608-4565-14-7, Ohrid, Macedonia, 2. - 4. Sep, 2020.

3. Radovi u časopisima nacionalnog značaja (M50)

3.1. Rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51)

1. **I. Gazikalović**, J. Jovanović, N. Šekuljica, N. Luković, S. Jakovetić Tanasković, Z. Knežević-Jugović, Optimization of submerged fermentation conditions for gluten-degrading enzyme production using *Bacillus subtilis* isolate, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, Article In Press, Vol. 34, March 2021.

4. Predavanja po pozivu na skupovima nacionalnog značaja (M60)

4.1. Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

1. Knežević-Jugović, Z., **Gazikalović, I.**, Jovanović, J., Antov, M., Nedović, V., Comparison of enzymatic and microwave treatments for gluten reduction of barley mash, Second Scientific-expert Symposium with international participation "Beer, brewing raw materials and equipment", Zrenjanin, 27-30. august 2018., pp. 65, Lecture abstracts, ISBN 978-86-80050-16-4.

5. Tehnička rešenja (M80)

5.1. *Novo tehničko rešenje primenjeno na međunarodnom nivou (M81)*

1. N. Šekuljica, J. Jovanović, N. Luković, S. Jakovetić Tanasković, **I. Gazikalović**, A. Stefanović, Z. Knežević-Jugović, Primena enzimskog procesa i sonikacije za unapređenje prinosa proteina i kvaliteta proteinskog brašna (Application of enzymatic process and sonication for protein meal improvement), Novo tehničko rešenje primenjeno na međunarodnom nivou rađeno za norvešku firmu verifikovano od strane MNO prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, 2020.

5.2. *Prijava domaćeg patenta (M87)*

1. D. Mijin, J. Tadić, T. Stanojković, I. Marić, J. Ladarević, A. Mašulović, **I. Gazikalović**, Nova biološki aktivna azo jedinjenja na bazi 4-(4-aminofenil)-5-etoksikarbonil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona i različitih 2-piridona, PP-2020/1468, 2020.

1.3. Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

U svom dosadašnjem angažovanju tokom doktorskih studija i u okviru naučno-istraživačkog rada na projektu integralnih i interdisciplinarnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, **Ivana Gazikalović**, master inženjer tehnologije, je postigla značajne rezultate, zainteresovanost i stručnost za naučno-istraživački rad. Iz oblasti kojoj pripada predložena tema doktorske disertacije, kandidat je objavio kao koautor jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jedno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33), jedno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34), jedan rad kao prvi autor u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51) i jedno saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64). Na osnovu priloženih podataka o kandidatu i njegovom naučno-istraživačkom radu, Komisija smatra da **Ivana Gazikalović**, master inženjer tehnologije, ispunjava uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

2. Predmet i cilj istraživanja

Predmet naučnog istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti smanjenja alergenosti glutena iz pšeničnog brašna primenom enzimskih i netermičkih tretmana. Nakon primene ovih tretmana ispitaće se svojstva dobijenih proteinskih frakcija u pogledu njihove alergenosti, strukturnih promena, kao i tehnološko-funkcionalnih svojstava.

Sa porastom populacije i sve većim zahtevima za dostupnost hrane, prehrambena industrija se menja u pravcu pronalaženja alternativnih izvora hrane i tehnologija za njihovu obradu. Industrije moraju da implementiraju nove tehnologije u svoje proizvodne procese kako bi proizveli hranu i suplemente određenih kvaliteta, a istovremeno da zadrže ili smanje potrošnju energije, vode i hemikalija. S obzirom da pšenica predstavlja jednu od glavnih namirnica koje se koriste u ljudskoj ishrani, a i šire, njeno iskorišćenje i primena je od velikog značaja za industriju. Pšenično brašno se najčešće primenjuje u proizvodnji pekarskih proizvoda, hlebova i kolača. Gluten predstavlja najveću proteinsku frakciju među skladišnim proteinima pšeničnog zrna. S obzirom da je veoma lako dostupan kao glavni nusproizvod u industriji skroba, može se iskoristiti u različitim procesima proizvodnje prehrambenih proizvoda.

Gluten poreklom iz pšeničnog brašna se sastoji od dve proteinske frakcije, glijadina, odnosno frakcije proteina rastvorljivih u alkoholima, i glutenina, frakcije proteina rastvorljivih u

rastvorima kiselina i baza. Obe navedene proteinske frakcije glutena bogate su glutaminom i prolinom, čime doprinose kvalitetu proteina pšenice sa aspekta aminokiselinskog sastava. Kada im se doda voda, glijadini doprinose viskozitetu i ekstenzibilnosti testa, dok su glutenini odgovorni za jačinu i elastičnost testa. Proteini glutena su povezani sa mnogim bolestima i poremećajima, koji se mogu svrstati u nekoliko kategorija, i to: autoimune, alergijske i urođene. Kako bi se izbegao imuni odgovor u bilo kom obliku, proteini glutena se moraju razgraditi u gastrointestinalnom traktu čoveka tako da dugi peptidni lanci koji u sebi sadrže toksične epitope ne dođu u kontakt sa sluzokožom creva. Istraživanja su do sada pokazala da peptidni lanci kraći od 9 aminokiselina mogu proći kroz digestivni trakt čoveka, a da pri tome ne izazivaju bilo kakav imuni odgovor ili negativne efekte. Međuti, duži fragmenti mogu izazvati kaskadne imunogene reakcije i druge poremećaje.

Pored konvencionalnog pristupa u formulisanju bezglutenskih proizvoda koji se zasniva na obogaćivanju bezglutenskih zamesa različitim funkcionalnim ingradijentima, najnovija i najpodsticajnija istraživanja su usmerena na modifikaciju samog glutena u cilju smanjenja njegovog alergnog potencijala uz očuvana funkcionalna i reološka svojstva. Predmet savremenih istraživanja je primena enzimskih tehnologija u cilju smanjenja alergnosti glutena, tačnije skraćivanja peptidnih lanaca koji nose u sebi toksične epitope pomoću proteolitičkih enzima. Na ovaj način bi potencijalno mogao da se promeni pristup u proizvodnji bezglutenske hrane u pravcu smanjenja toksičnosti glutena u pšeničnim proizvodima umesto njegove eliminacije iz proizvoda. U ovom radu će biti ispitana mogućnost smanjenja alergnosti glutena primenom dva pristupa. Prvi pristup se zasniva na primeni specifičnih proteaza proizvedenih iz sopstvenih sojeva iz kolekcije mikroorganizama na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta i utvrđivanju optimalnih uslova za njihovo delovanje, dok se drugi zasniva na primeni komercijalnih enzima poput alkalaze (proteaza iz *Bacillus licheniformis*), pronaze (proteaza iz *Streptomyces griseus*) i drugih. U početnim ispitivanjima izvršice se odabir mikroorganizama u pogledu njihove sposobnosti da sintetišu i produkuju proteazu koja može da razgrađuje gluten u ekstracelularni medijum, tako što će se pratiti njihovo gajenje na specifičnim podlogama sa glutenom. Nakon detekcije rasta na specifičnim podlogama, za dalji rad će biti odabrani najpotentniji sojevi sa aspekta produkcije specifičnih proteaza koje pokazuju veliku aktivnost prema model supstratu Gly-Pro-*p*-nitroanilid i utvrđice se optimalni uslovi kultivacije odabranog mikroorganizma sa aspekta prinosa enzima.

Isto tako, ispitaće se učinkovitost nekoliko komercijalnih enzima u razgradnji epitopa pšeničnog glutena i uporediti sa dejstvom proizvedenih proteaza. Komercijalne proteaze poput alkalaze biće primenjene u dva hidrolitička sistema, na sirovom pšeničnom brašnu i na izdvojenom glutenu kao model proteinu. Poređenje efikasnosti komercijalnih enzima u realnim i model sistemima može da doprinese razumevanju uticaja ostalih neproteinskih komponenti pšeničnog brašna na tok hidrolize i potencijalno smanjenje alergnih svojstava, što može da bude od značaja jer su u literaturi obično opisana ispitivanja na model proteinu. Pšenično brašno sadrži skrob u značajnoj količini, pa je od interesa ispitati uticaj prisustva skrobnih materija u različitim koncentracijama u postupku hidrolize pšeničnog brašna na smanjenje njegove alergnosti. Pored enzimske hidrolize, razmatraće se uticaj različitih fizičkih metoda na potencijalno smanjenje alergnosti glutena, kako samih, tako i u kombinaciji sa enzimskim postupkom.

U novije vreme upotreba mikrotalasa kao načina zagrevanja je sve češća zbog niza prednosti poput homogenog zagrevanja reakcione smeše, velike količine energije prenesene u jedinici vremena, povećanog prinosa reakcije, smanjenja neželjenih rizika koje prati termičko

zagrevanje, mogućnost višestrukog ubrzanja procesa i drugo. Sve češće se mikrotalasni tretman navodi u savremenoj literaturi i kao novi postupak za smanjenje alergености glutena i drugih proteina zahvaljujući uticaju mikrotalasa, ali i termičkom efektu koji se ogleda u promeni strukture proteina, a samim tim i promeni konformacije epitopa i usled toga, njihove алергености. U doktorskoj disertaciji prvo će se ispitati uticaj mikrotalasnog pretretmana na алергеност glutena pri različitim uslovima da bi se tretman koji pokaže najbolje dejstvo u pogledu smanjenja detektovane алергености primenio dalje u kombinaciji sa enzimskom hidrolizom u cilju još većeg smanjenja алергеног potencijala ovog proteina.

Pored uticaja na алергеност proteina, mikrotalasni tretman menja i konformaciju proteina pri čemu se menjaju i njihova funkcionalna svojstva. U literaturi se navodi da pod određenim uslovima pod dejstvom mikrotalasa može doći do unapređenja funkcionalnih svojstava proteina, rastvorljivosti i svarljivosti, pri čemu su očuvane nutritivne вредности. Zbog toga, svim dobijenim hidrolizatima (enzimskim hidrolizatima brašna, mikrotalasno tretiranim uzorcima glutena i mikrotalasno pretretiranim hidrolizatima glutena), pored алергености, ispitaće se funkcionalna svojstva kao što su kapacitet penjenja i stabilnost пене, индекс emulgujuće активности i emulzione stabilnosti i rastvorljivost. Isto tako, hidrolizom proteina glutena mogu se odoboditi bioaktivni peptidi, odnosno kraći fragmenti proteina, koji pokazuju različite биолошке активности uključujući antimikrobnу, antioksidativnu, antikancerogenu, antikoagulacionu i druge. U tom smislu, hidrolizatima dobijenim pod različitim uslovima pratiće se i upoređivati antimikrobne активности na kulturama *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Escherichia coli* kao i sposobnost neutralizuje radikalskog katjona ABTS⁺ i heliranja jona metala. Velika pažnja u radu će se usmeriti na rasvetljavanje uticaja mikrotalasa na strukturu glutena, naročito u poređenju sa termičkim tretmanom kao i utvrđivanju korelacije promena u strukturi i алергености fragmenta. Na osnovu dobijenih rezultata izvršiće se poređenje primenjenih metoda za smanjenje алергености glutena. Poređenjem i detaljnom analizom utvrdiće se koji faktori utiču na smanjenje алергеног potencijala i koji postupak ima najveći potencijal za dalju primenu na industrijskom nivou.

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije predstavlja pronalaženje novih i efikasnih biotehnoloških postupaka i netermičkih tretmana za smanjenje алергеног potencijala glutena poreklom iz пшеничног brašna. Jedan od predmeta istraživanja ove disertacije jeste odabir efikasnog enzimskog preparata, a samim tim i primena enzimske hidrolize u cilju proteolitičke razgradnje glutena na manje frakcije čime će se smanjiti dužina peptidnog lanca u dovoljnoj meri, tako da se izbegne имуни одговор prilikom ulaska u intestinalni trakt čoveka. Drugi pristup se ogleda u primeni i optimizaciji mikrotalasnog tretmana u cilju modifikacije glutena. Takođe razmotriće se биолошке активности tretiranih proteina i dobijenih peptida kao što su: antioksidativna, metal-jon helatna i antimikrobna svojstva. Vršiće se optimizacija procesnih parametara enzimske hidrolize u cilju dobijanja биолошки активних peptida sa unapređenim svojstvima i redukovanim алергеним potencijalom. Pojedinačni ciljevi su:

- 1) optimizacija biotehnološkog postupka hidrolize glutena u šaržnom reaktorskom sistemu sa aspekta izbora enzimskog preparata, temperature, pH, koncentracije supstrata, vrste supstrata i enzima;
- 2) utvrđivanje načina izvođenja i optimalnih parametara enzimske hidrolize glutena sa aspekta poboljšanja i očuvanja nutritivnih svojstava i биолоških активности;
- 3) ispitivanje uticaja prisutnih komponenti пшеничног brašna (skroba) tokom enzimske hidrolize na tok hidrolize i алергеност;

- 4) ispitivanje uticaja mikrotalasa na strukturu glutena i posledično detektovani alergeni potencijal;
- 5) ispitivanje mogućnosti primene mikrotalasa i optimizacija mikrotalasnog pretretmana u cilju poboljšanja efikasnosti enzimске hidrolize i efikasnijeg smanjenja alergености glutena u dobijenim hidrolizatima;
- 6) ispitivanje tehnološko-funkcionalnih svojstava dobijenih hidrolizata glutena, mikrotalасно pretretiranih model proteina, mikrotalасно pretretiranog pšeničnog brašna;
- 7) utvrđivanje korelacije između različitih uzoraka mikrotalасно tretiranog glutena kao i hidrolizata glutena, odnosno utvrđivanje korelacije između strukture proteinskih frakcija i njihove алергености, kao i korelacije između strukture i биолошких i tehnološko-funkcionalnih svojstava;
- 8) ispitivanje mogućnosti primene bakterijske kulture roda *Bacillus* i drugih, kao producenta specifičnog протеолитичког enzima за cilјanu razgradnju тоksičnih epitopa u molekulu proteina glutena;
- 9) optimizacija postupka i uslova proizvodnje протеолитичког enzima bakterijskom kulturom roda *Bacillus*.

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

- [1] Allred, L.K. & Ritter, B.W., 2010. Recognition of gliadin and glutenin fractions in four commercial gluten assays. *Journal of AOAC International*, 93(1), 190-196.
- [2] Arendt, E.K. & Zannini, E., 2013. Wheat and other Triticum grains. In: *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. s.l.:Woodhead Publishing Limited, pp. 1-66.
- [3] Banik, S., Bandyopadhyay, S. & Ganguly, S., 2003. Bioe ~~facts of microwave~~ *Bioresource Technology*, 87, 155-159.
- [4] Elmalimadi, M.B., Stefanović, A.B., Šekuljica, N.Ž., Žuža, M.G., Luković, N.D., Jovanović, J.R., Knežević-Jugović, Z.D., 2017. The synergistic effect of heat treatment on alcalase - assisted hydrolysis of wheat gluten proteins: Functional and antioxidant properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (5), e13207.
- [5] Elmalimadi, M.B., Jovanović, J.R., Stefanović, A.B., Jakovetić Tanasković, S., Djurović, S. B., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z.D., 2017. Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. *Industrial Crops and Products*, 109, 548-557.
- [6] Kong, X., Zhou, H. & Qian, H., 2007. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 102, 759–763.
- [7] Kristinsson, H.G. & Rasco, B.A., 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81.
- [8] Lamacchia, C., Landriscina L., & D'Agnello, P., 2016. Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment. *Food Chemistry*, 197, 634-640.
- [9] Maningat, C.C. et al., 2009. Wheat Starch: Production, Properties, Modification and Uses. In: J. BeMiller & R. Whistler, eds. *Starch: Chemistry and Technology, Third Edition*. 3 ed. s.l.:Elsevier Inc., pp. 441-510.

- [10] Mohan Kumar, B.V., Sarabhai, S. & Prabhasankar, P., 2019. Targeted degradation of gluten proteins in wheat flour by prolyl endoprotease and its utilization in low immunogenic pasta for gluten sensitivity population. *Journal of Cereal Science*, 87, 59-67.
- [11] Popineau, Y., Huchet, B., Larré, C. & Bérot, S., 2002. Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, 35, 327-335.
- [12] Rallabhandi, P., Sharma, G.M., Pereira M. & Williams, K.M., 2015. Immunological characterization of the gluten fractions and their hydrolysates from wheat, rye and barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1825-1832.
- [13] Sapone, A. et al., 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10, 13.
- [14] Scherf, K.A., Koehler, P. & Wieser, H., 2016. Gluten and wheat sensitivities - An overview. *Journal of Cereal Science*, 67, 2-11.
- [15] Scherf, K.A., Wieser, H. & Koehler, P., 2018. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*, 110, 62-72.
- [16] Stressler, T., Eisele, T., Baur, C., Wangler, J., Kuhn, A., Fischer, L. 2015. Extracellular peptidases from insect and compost-associated microorganisms screening and usage of wheat gluten hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 241(2), 263–274.
- [17] Wieser, H., 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115–119.
- [18] Wieser, H., 2008. Detection of gluten, in *Gluten-free cereal products and beverages*, E.K. Arendt and F. Dal Bello, Eds., Elsevier: Academic Press, pp. 47-80.
- [19] Wieser, H. & Koehler, P., 2008. The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chemistry*, 85(1), 1-13.
- [20] Yalcin, E., Sakiyan, O., Sumnu, G., Celik, S. & Koksels, H., 2008. Functional properties of microwave treated gluten. *European Food Research Technology*, 227, 1411-1417.

3. Polazne hipoteze

Istraživanja u okviru predložene doktorske disertacije polaze od hipoteze da se postupkom enzimske hidrolize, netermičkim tretmanom ili pak njihovim sinergističkim dejstvom može efikasno i specifično delovati na epitope u molekulu glutena i modifikovati struktura molekula na način da se smanji alergnost. Pored toga, polazi se i od hipoteze da će ove promene u strukturi molekula ujedno doprineti poboljšanju funkcionalnih i bioloških svojstava ovog proteina poreklom iz pšenice.

Kako je na osnovu uvida u literaturu poznato da usled enzimske hidrolize različitih biljnih i životinjskih proteina dolazi do oslobađanja kraćih sekvenci proteina koje imaju izraženu biološku aktivnost, pretpostavka je da će se hidrolizom glutena pomoću odabranih proteaza osloboditi bioaktivni peptidi. Primenom netermičkih postupaka, kao što je mikrotalasni tretman, može se izvršiti strukturna modifikacija glutena dejstvom elektromagnetnih talasa frekvencije od 300 MHz do 300 GHz koji izazivaju molekularne vibracije. Te promene se najpre očekuju u tercijarnoj i sekundarnoj strukturi glutena, pri čemu dolazi do raskidanja disulfidnih mostova i drugih nekovalentnih interakcija u molekulu proteina kao i promeni udela α -heliksa i β -ploča u sekundarnoj strukturi. Na osnovu detektovanih promena u sekundarnoj strukturi proteina

pomoću FTIR i Ramanove spektroskopije, kao i na osnovu utvrđenog sadržaja ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa, rasvetliće se inter- i intramolekulske promene u molekulu glutena, kao npr. da li dolazi do agregacije i odmotavanja molekula primenom mikrotalasa. Prilikom ovih ispitivanja potrebno je obratiti pažnju na primenjenu snagu mikrotalasa kao i na vremenski period u kome je protein glutena izložen njihovom dejstvu. Usled suviše intenzivnog mikrotalasnog tretmana, može doći do suprotnog efekta i do negativnih konformacionih promena koje rezultuju u smanjenoj ekstraktabilnosti, povećanju količine prisutnih SH grupa i narušavanju tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina. Iz tog razloga je bitno ustanoviti optimalnu snagu primenjenog mikrotalasnog tretmana i vremena izlaganja proteina, kako bi se sa što većom efikasnošću smanjila njegova alergenost, ali i zadržala važna funkcionalna svojstva. Kako bi se ispunili svi ovi zahtevi, potrebno je izvršiti opsežna ispitivanja u pogledu primenjene snage mikrotalasa i vremena izlaganja. Ovime bi se izvršila optimizacija postupka i odredili konačni parametri za mikrotalasni tretman, bilo da se on izvodi odvojeno ili u kombinaciji sa enzimskim tretmanom. Važno je istaći da su preliminarni rezultati pokazali da mikrotalasni tretman značajno utiče na promenu strukture glutena kao i na povećanje prisutnih sulfhidrilnih grupa na površini molekula odgovornih za formiranje disulfidnih mostova.

Druga hipoteza odnosi se na primenu enzimskog postupka u strogo kontrolisanim uslovima u cilju smanjenja alergenosti proteina glutena. Očekuje se da će se primenom odgovarajućeg proteolitičkog enzima dobiti bioaktivni peptidi smanjene alergenosti, unapređenih tehnološko-funkcionalnih i bioloških svojstava. Izvođenjem enzimske hidrolize u šaržnom sistemu sa mešanjem pri različitim procesnim uslovima i ispitivanjem odnosa koncentracije supstrata i enzima, optimizovaće se postupak enzimske hidrolize uzimajući u obzir funkcionalna i biološka svojstva. Takođe, biće vršeno merenje alergenog potencijala dobijenih hidrolizata kompetitivnim ELISA testom. Na osnovu ovih podataka, kao i podataka iz prethodne hipoteze, može se otići korak dalje, i ispitati sinergističko dejstvo mikrotalasnog pretretmana i enzimske hidrolize.

Treća hipoteza se odnosi na sinergističko dejstvo mikrotalasnog pretretmana i enzimskog preparata. Delovanjem mikrotalasa dolazi do strukturnih promena na osnovu kojih posledično može doći do izmene regija koje su dostupne delovanju enzima tokom hidrolize. Dakle, promenom konformacije proteina usled dejstva mikrotalasa, menja se i način delovanja odabranog enzima, pri čemu se može omogućiti specifično delovanje enzima na odabrane peptidne veze u molekulu glutena i dobijanje proteinskih hidrolizata željenih svojstava. Pregledom literature potvrđeno je da određeni proteolitički enzimi imaju sposobnost da razgrade različite biljne i životinjske proteine na manje peptide, kao i da mikrotalasni tretman efikasno deluje na smanjenje detektovane alergenosti ELISA testom, ali su podaci o alergenosti glutena nakon dejstva mikrotalasima i različitim proteazama dosta protivrečni.

S obzirom na dostupne literaturne podatke da se u ispitivanjima uglavnom koriste cela zrna pšenice ili samo pšenično brašno, od kojih je prethodno formirano testo, a iz kog su potom sekvencijalnim hemijskim postupcima izolovane glavne proteinske frakcije glutena (glijadini i glutenini) i kao takve tretirane odabranim biotehnološkim postupcima, kao treća hipoteza navodi se ispitivanje mogućnosti primene enzimskog i mikrotalasnog tretmana na sirovom pšeničnom brašnu kao realnom supstratu. Ovakvim postupkom se izbegava trošenje prevelikih količina vode i hemikalija, kao što je to u industriji skroba, kako bi se izdvojio sirovi gluten. Shodno tome,

ispitaće se mogućnost i efikasnost primene enzimskog preparata za hidrolizu samog pšeničnog brašna, koje, pored glutena, sadrži značajnu količinu skroba i drugih neproteinskih komponenata. Pregledom literaturnih podataka, prisustvo skrobnih materija otežava formiranje glutenske mreže u prisustvu vode, pri čemu proteini ne formiraju u velikoj meri teško raskidive intermolekulske interakcije i ostaju dostupniji dejstvu proteaza. Polazeći od ove hipoteze primarni cilj biće optimizacija postupka enzimske hidrolize glutena u prisustvu skroba u cilju smanjenja alergenosti i unapređenja tehnološko-funkcionalnih i bioloških svojstava dobijenih hidrolizata.

Osim primene komercijalnih enzimskih preparata i standardnih metoda hidrolize, ispitaće se i mogućnost proizvodnje specifičnog enzimskog preparata iz različitih mikroorganizama iz kolekcije Tehnološko-metalurškog fakulteta, naročito roda *Bacillus*. Pretpostavka je da mikroorganizmi koji pokazuju snažan rast na specifičnim podlogama koje sadrže gluten kao jedini izvor ugljenika, ekstracelularno produkuju proteaze koje efikasno razgrađuju frakcije glutena. Cilj ovog dela naučnog ispitivanja biće optimizacija uslova pri kojima bi odabrani soj proizvodio specifičnu proteazu i ispitivanje njene specifičnosti na model supstratima. Biće ispitana proteolitička aktivnost dobijenog enzimskog preparata, a shodno postignutim rezultatima biće odlučeno o mogućnosti njegove dalje primene.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije baziraće se na prethodno navedenim hipotezama i shodno tome može se pretpostaviti da će se primenom izloženih metoda razviti novi postupak procesa hidrolize pšeničnog proteina, kao i njegove modifikacije, a sve u cilju dalje bezbedne primene sa aspekta alergenosti. Očekuje se da će se u oblasti ispitivanja modifikacije glutena doći do unapređenja tehnološko-funkcionalnih i bioloških svojstava hidrolizata i mikrotalasno pretretiranih uzoraka.

4. Naučne metode istraživanja

U cilju realizacije naučno-istraživačkih ciljeva u okviru ove doktorske disertacije istraživanja će biti započeta odabirom mikroorganizama u pogledu njihove sposobnosti da sintetišu i produkuju enzim, proteazu, u ekstracelularni medijum, tako što će se pratiti njihovo gajenje na specifičnim podlogama koje sadrže gluten kao jedini izvor ugljenika. Na tako posebno pripremljene selektivne podloge, biće zasejani *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp. TMF, *Bacillus* sp. TMF-2 i drugi. Nakon detekcije rasta na specifičnim podlogama, za dalji rad će biti odabrani najpotentniji sojevi. Odabrani mikroorganizmi biće presejani na sladni agar i nakon postizanja zadovoljavajućeg rasta, ponovo u tečnu fermentacionu podlogu, koja će takođe sadržati gluten. Pratiće se kinetika rasta biomase i enzimska aktivnost na model supstratu Gly-Pro-p-nitroanilid. Nakon početnog odabira proizvodnog mikroorganizma ispitaće se mogućnost primene za proizvodnju specifičnog enzima za degradaciju glutena i komercijalnog enzimskog preparata, kao i primena u postupku enzimske hidrolize u šaržnom sistemu sa mehaničkim mešanjem u kontrolisanim uslovima temperature i pH vrednosti reakcije. Kao prvi uslov nameće se sposobnost proizvedenog i odabranog enzimskog preparata da hidrolizuje proteinske frakcije glutena, na model proteinu, čime bi se smanjila njegova alergenost. Nakon odabira enzimskog preparata, dalja istraživanja će se fokusirati na praćenje toka enzimske hidrolize pH-stat metodom, kojom se određuje postignuti stepen hidrolize. Ova metoda bazirana je na praćenju količine oslobođenih α -amino grupa direktno proporcionalnih količini utrošene baze određenog normaliteta za održavanje optimalne pH vrednosti reakcije, a na osnovu kojih se dolazi do

podatka o postignutom stepenu hidrolize. Količina oslobođenih α -amino grupa će biti verifikovana i primenom metode sa 2,4,6-trinitrobenzensulfonskom kiselinom (TNBS metoda).

Kvantitativno određivanje sadržaja proteina u hidrolizatima vršiće se standardnom metodom po Loriju, koristeći goveđi serum albumin (BSA) kao referentni standard. Takođe, metodom po Kjeldalu će se odrediti i ukupni sadržaj proteina u svim uzorcima.

Mikrotalasni tretman vršiće se primenom mikrotalasnog reaktora (Anton Paar Monowave 300, Anton Paar GmbH, Austrija) u kontrolisanim uslovima. Tretman će se izvoditi primenom različitih snaga mikrotalasa, u različitim vremenskim periodima i pri različitim temperaturama.

Praćenje raspodele molekulskih masa proizvedenih hidrolizata, mikrotalasno tretiranih proteina glutena, kao i mikrotalasno pretretiranih hidrolizata, vršiće se pomoću SDS-PAGE elektroforeze na aparaturi za vertikalnu elektroforezu (Hoefer™ Mighty Small™ II Mini Vertical Electrophoresis System, GE Healthcare Life Sciences, SAD). Izolovanje i prečišćavanje frakcija peptida, okarakterisanih kao niskoalergenih i biološki najaktivnijih sa aspekta antioksidativne aktivnosti izvršiće se preparativnom gel-filtracionom hromatografijom primenom kolone za čije punjenje će se koristiti komercijalno dostupna suspenzija Toyopearl HW-40F (metakrilni polimer sa uvedenim hidroksilnim grupama koji služi za razdvajanje biomolekula u opsegu molekulskih masa 10-0,1 kDa). Isto tako primeniće se tečno masena (LC-MS) i reverzno-fazna hromatografija visokih performansi (RC-HPLC) primenom semi-preparativne i analitičke C-18 kolone. Na osnovu dobijene raspodele, moguće je detaljnije ispratiti i analizirati efikasnost delovanja procesa enzimske hidrolize, mikrotalasnog tretmana ili kombinovanog tretmana, time što se prati odsustvo određenih toksičnih frakcija glutena određenih molekulskih masa.

Promene u strukturi glutena nakon tretmana mikrotalasima pratiće se pomoću Ramanove i FTIR spektroskopije. Ramanova spektroskopija odlično detektuje čak i veoma male promene u sekundarnoj strukturi proteina na osnovu promene intenziteta i položaja pikova, naročito u oblasti amida I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$), amida II ($1510-1560\text{ cm}^{-1}$) i amida III ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$). Površinska hidrofobnost pretretiranih proteinskih frakcija glutena odrediće se spektrofotometrijski pomoću sprektrofluorimetra (Horiba FluoroMax® 4) prema modifikovanoj metodi iz literature.

Kako bi se odredio alergeni potencijal tretiranih uzoraka, biće primenjen kompetitivni ELISA imunotest (RIDASCREEN Gliadin Competitive, R-Biopharm, Darmstadt, Nemačka). Ovim testom određuje se količina prisutnog glijadina u željenom uzorku. Na osnovu podataka o sadržaju glijadina dolazi se do procene o prisutnoj količini glutena u uzorku. Na osnovu međunarodnih propisa koje je dao *Codex Alimentarius*, ukoliko sadržaj glutena ne prelazi količinu veću od 20 mg/kg, proizvod se može smatrati bezbednim, i obeležiti kao „bezglutenski“. U cilju što preciznije detekcije, bilo je potrebno prethodno optimizovati metodu i uvesti određene korekcije.

S obzirom da se hidrolizom oslobađaju biološki aktivni peptidi, biće ispitana sposobnost delovanja dobijenih uzoraka kao antioksidativnih i antimikrobnih sredstava. Antioksidativna aktivnost biće određivana spektrofotometrijskim metodama, i to merenjem sposobnosti dobijenih peptida da redukuju radikalski katjon ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i heliraju jone metala (jone gvožđa). Antimikrobno delovanje dobijenih hidrolizata proteina glutena ispitaće se *in vivo*. Testom koji se bazira na difuziji kroz agarnu podlogu, biće određena širina zone inhibicije. Mikroorganizmi koji će biti korišćeni u ovom ispitivanju potiču iz kolekcije mikroorganizama laboratorije za mikrobiologiju TMF-a, Univerziteta u Beogradu. Konkretno, testovi će se sprovesti na Gram-pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC

25923, Gram-negativnoj bakteriji *Escherichia coli* ATCC 25922 i kvascu *Candida albicans* ATCC 24433.

5. Očekivani naučni doprinos

Očekuje se da će rezultati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije dati značajan naučni doprinos razumevanju mehanizama delovanja mikrotalasa i odabranih proteaza na strukturu glutena i alergena svojstva, kao i na uspostavljanje korelacije između određenih strukturnih promena, alergenosti i funkcionalnih svojstava. Poseban doprinos se očekuje i u utvrđivanju novih bioaktivnih sekvenci u proteinskim frakcijama glutena. Pri tome, očekuje se da će dobijeni rezultati dati bolji uvid u mehanizme delovanja mikrotalasa, delovanja mikrotalasa uz naknadnu enzimsku hidrolizu, kao i mehanizam enzimске hidrolize glutena u prisustvu skroba. Sve ovo može doprineti smanjenju alergeni svojstava proteina glutena i do unapređenja njegovog iskorišćenja u vidu hidrolizata dobijenih postupkom enzimске hidrolize, mikrotalasno tretiranog glutena i mikrotalasno pretreniranih hidrolizata dobijenih enzimskom hidrolizom.

Pregledom literature, primetno je da su istraživanja uglavnom bazirana na hidrolizi model proteina (prečišćenog glutena) ili glutena dobijenog iz određene vrste pšeničnog zrna/brašna postupcima izolovanja pomoću različitih hemijskih postupaka u uslovima koji nisu strogo kontrolisani. Naime, ispitivanja dejstva mikrotalasa su bila ograničena na komercijalno dostupne mikrotalasne pećnice, čijom upotrebom nemamo tačne informacije o postignutim temperaturama unutar uzorka tokom tretmana, vremenu trajanja mikrotalasnog tretmana, odnosno tačnom vremenskom intervalu izlaganja mikrotalasima. Osim toga, takvi uređaji ne obezbeđuju uniformno mešanje tokom izlaganja uzorka mikrotalasima, a pećnice u većini slučajeva imaju prethodno određene snage koje se mogu primeniti. Pored toga, dobijeni rezultati pri razmatranju enzimskih i mikrotalasnih tretmana glutena su dosta neusaglašeni jer u zavisnosti od primenjenog uređaja za generisanje mikrotalasa ili proteaze dolazi ili do značajnog smanjenja ili, po nekim autorima, čak povećanja alergenosti glutena. Shodno tome, kao i na osnovu prethodno navedenog, naučni doprinos ove disertacije ogleda se u sledećem:

- utvrđivanje mehanizma dejstva mikrotalasa na strukturu glutena u mikrotalasnom reaktoru sa potpuno kontrolisanim procesnim parametrima (mešanje, temperatura, snaga, vreme izlaganja mikrotalasima);
- utvrđivanje optimalnih procesnih parametara enzimске hidrolize glutena pomoću alkalaze i pronaze u šaržnom sistemu sa mešanjem u pogledu smanjenja alergeni potencijala i unapređenja funkcionalnih i bioloških svojstava;
- utvrđivanje optimalnih procesnih parametara enzimске hidrolize pšeničnog brašna pomoću alkalaze i pronaze u šaržnom sistemu sa mešanjem u pogledu smanjenja alergeni potencijala i unapređenja funkcionalnih i bioloških svojstava; Razmatranje uticaja koncentracije skroba na enzimsku hidrolizu i svojstva dobijenih hidrolizata;
- utvrđivanje optimalnih parametara mikrotalasnog postupka i naknadne enzimске hidrolize pomoću odabrane proteaze; Utvrđivanje uticaja mikrotalasa na brzinu enzimске hidrolize na osnovu ispitivanja kinetike reakcije i kinetičkih parametara;
- utvrđivanje sastava hidrolizata i karakterizacija dobijenih biološki aktivnih peptida;
- utvrđivanje korelacije između strukture proteinskih frakcija glutena (dužine sekvence, udela α -heliksa, β -ploča i neuređenih elemenata sekundarne strukture, sadržaja sulfhidrilnih grupa, stepena hidrofobnosti površine) i alergenosti, funkcionalnih i bioloških svojstava dobijenih peptida.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije odnosiće se na optimizaciju postupka primene mikrotalasnog tretmana, enzimske hidrolize i njihovog sinergističkog dejstva u cilju smanjenja alergennog potencijala glutena. Tokom optimizacije mikrotalasnog tretmana ispitaće se mogućnost primene mikrotalasa snage u opsegu 100–800 W za tretman proteina glutena u cilju smanjenja alergennog potencijala, kao i njen uticaj na dalju enzimsku hidrolizu. Takođe biće ispitan i uticaj koncentracije skroba tokom enzimske hidrolize na smanjenje alergennog potencijala, kao i na biološka i tehnološko-funkcionalna svojstva dobijenih hidrolizata.

U skladu sa predloženim planom istraživanja, očekuje se da će u doktorskoj disertaciji biti obrađena sledeća poglavlja: *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija*, *Zaključak* i *Literatura*.

U poglavlju *Uvod* biće definisan predmet istraživanja, značaj doktorske disertacije kao i osvrt na aktuelnu problematiku, doprinos i glavne ciljeve.

U poglavlju *Teorijski deo* biće dat pregled trenutno dostupnih literaturnih podataka u okviru istraživanja na temu smanjenja alergennosti glutena primenom mikrotalasa, proizvodnje i primene enzimskih preparata i enzimske hidrolize glutena. Takođe, osvrt će biti dat i na karakteristike proizvedenih bioaktivnih peptida glutena i njihovih bioloških svojstava. Razmotriće se primena mikrotalasnog tretmana, kao i njegove kombinacije sa enzimskom hidrolizom kao jedno od rešenja za smanjenje alergennog potencijala glutena, pri čemu će dobijeni proizvodi zadržati svoje biološke karakteristike. Razmotriće se primena enzimske hidrolize proteina glutena u prisustvu skroba, u cilju olakšanja razgradnje toksičnih frakcija glutena.

U poglavlju *Eksperimentalni deo* biće opisani mikrotalasni tretman, enzimska hidroliza netretiranih i mikrotalasno tretiranih uzoraka, enzimska hidroliza realnog supstrata- pšeničnog brašna, selekcija mikroorganizma na selektivnim podlogama i submerzna proizvodnja i primena dobijenog enzima za hidrolizu glutena pomoću odabranog proizvodnog mikroorganizma, karakterizacija uzoraka, svi kao deo postavljenih hipoteza i ciljeva istraživanja. Ovo poglavlje će sadržati:

- materijale korišćene tokom istraživanja u okviru izrade doktorske disertacije;
- spisak opreme korišćene tokom eksperimentalnog rada;
- metode i primenjene tehnike za izvođenje eksperimenata;
- postupak proizvodnje specifične proteaze iz odabranih mikroorganizama tehnikom submerznog gajenja;
- tretman mikrotalasima u mikrotalasnom reaktoru;
- optimizaciju postupaka mikrotalasnog tretmana, enzimskih hidroliza, detekcije alergennih frakcija;
- određivanje promena u strukturi molekula glutena i
- određivanje i karakterizaciju tehnološko-funkcionalnih svojstava i bioloških aktivnosti dobijenih hidrolizata proteina.

U poglavlju *Rezultati i diskusija* biće analizirani dobijeni eksperimentalni rezultati. Rezultati koji se odnose na proizvodnju specifične proteaze iz odabranih mikroorganizama tehnikom submerznog gajenja, biće upoređeni sa primenom komercijalnog enzimskog preparata, sa aspekta enzimske aktivnosti i sposobnosti da razgrade proteinske frakcije glutena. Nakon toga će se izvršiti odabir proteaze sa zadovoljavajućom enzimskom aktivnošću i specifičnošću za dalji

eksperimentalni rad. Nakon toga biće prodiskutovani rezultati dobijeni mikrotalasnim tretmanom nativnog glutena sa aspekta smanjenja njegove alergenosti i efikasnosti mikrotalasnog postupka. Dalje, biće analizirani i diskutovani rezultati izvedenih postupaka mikrotalasnog tretmana i enzimskih hidroliza pod različitim uslovima i biće razmatran uticaj procesnih parametara na kinetiku reakcije i svojstva dobijenih hidrolizata. Svi rezultati biće poređeni sa podacima dostupnim u naučnoj literaturi, na osnovu kojih će moći da se donese zaključak o efikasnosti proizvodnje i primene ovako pripremljenih uzoraka proteina.

U ovom poglavlju će biti sadržani grafički prikazi i diskusija sledećih eksperimentalnih istraživanja:

- optimizacija submerznog postupka proizvodnje specifične proteaze iz odabranog mikroorganizma i mogućnost njene primene za hidrolizu glutena;
- uticaj mikrotalasa na strukturu glutena i smanjenje alergnog potencijala kao i efikasnost njegove primene kao predtretmana u procesu enzimске hidrolize;
- optimizacija mikrotalasnog postupka i karakterizacija tretiranih uzoraka;
- optimizacija postupka enzimске hidrolize glutena u šaržnom sistemu sa mehaničkim mešanjem i kontrolom temperature i pH. Karakterizacija dobijenih uzoraka;
- optimizacija kombinovanog postupka enzimске hidrolize sa mikrotalasnim predtretmanom i karakterizacija dobijenih hidrolizata;
- raspodela molekulskih masa mikrotalasno tretiranih uzoraka i hidrolizata pomoću SDS-PAGE elektroforeze i gel-permeacione hromatografije; Promena strukture proteina analizirana pomoću FTIR i Ramanove spektroskopije;
- karakterizacija uzoraka sa aspekta antioksidativne i antimikrobne aktivnosti;
- poređenje alergnih svojstava mikrotalasno tretiranih uzoraka i hidrolizata.

U *Zaključku* će sumarno biti predstavljeni rezultati svih navedenih eksperimentalnih istraživanja. Biće diskutovana povezanost između primenjenih tretmana i strukture mikrotalasno tretiranih uzoraka i hidrolizata. Takođe biće izveden zaključak o optimalnim parametrima mikrotalasnog tretmana i enzimskih hidroliza, u cilju proizvodnje biološki aktivnih peptida smanjene alergnosti, očuvanih i/ili unapređenih funkcionalnih svojstava.

U poglavlju *Literatura* naći će se spisak citiranih naučnih radova i knjiga, korišćenih u doktorskoj disertaciji, uključujući i naučne radove proistekle iz eksperimentalnih istraživanja u okviru izrade ove doktorske disertacije.

7. Zaključak i predlog

Na osnovu izloženog, Komisija smatra da je predložena tema doktorske disertacije kandidata **Ivane Gazikalović** pod nazivom „**Enzimska modifikacija pšeničnog glutena u cilju smanjenja njegove alergnosti i poboljšanja funkcionalnih svojstava**“ naučno zasnovana i predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da prihvati i odobri izradu doktorske disertacije pod navedenim nazivom. Komisija smatra da je kandidat podoban za realizaciju naučnih ciljeva predviđenih planom doktorske disertacije. Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta da uputi zahtev Veću oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu za davanje saglasnosti na predlog teme doktorske disertacije. Istraživanja predviđena ovom doktorskom disertacijom pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, za

koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova. Za mentora se predlaže dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 02.03.2020.

ČLANOVI KOMISIJE

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

Dr Jelena Mijalković, naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Sladana Žilić, naučni savetnik
Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd