

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет:** Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Јелене Р. Јовановић, мастер инж. технологије.

Одлуком 35/154 бр. од 26.4.2018. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Јелене Р. Јовановић** под насловом

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

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

### РЕФЕРАТ

#### 1. УВОД

##### 1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

Школске 2011/2012 године (14.10.2011.) кандидат **Јелена Р. Јовановић**, мастер инж. технологије уписала је докторске академске студије на Универзитету у Београду, Технолошко-металуршки факултет, профил Биохемијско инжењерство и биотехнологија.

10.11.2016. - Кандидат **Јелена Р. Јовановић**, мастер инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „**Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација**“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме 24.11.2016. године (бр. одлуке 35/503).

23.2.2017. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, на основу поднетог реферата комисије, донета је одлука (бр. 35/32) о прихватању предлога теме докторске дисертације **Јелена Р. Јовановић**, мастер инж. технологије, под називом „**Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација**“, а за ментора ове докторске дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета.

27.3.2017. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Јелена Р. Јовановић, мастер инж. технологије, под називом „**Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација**“.

На захтев **Јелене Р. Јовановић**, студента докторских студија, а уз сагласност ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић, Наставно-научно веће је на седници одржаној 29. септембра

2017. донело Решење бр. 20/111 којим је одобрен продужетак рока за завршетак докторских студија за два семестра школске 2017/2018.

26.4.2018. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука о именовану комисије за оцену и одбрану докторске дисертације **Јелена Р. Јовановић**, мастер инж. технологије, под називом „**Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација**“ (бр. одлуке 35/154).

## 1.2. Научна област дисертације

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

## 1.3. Биографски подаци о кандидату

**Јелена Р. Јовановић**, мастер инжењер технологије, рођена је 4. децембра 1987. године у Смедереву, Република Србија, где је завршила основну школу и гимназију. Основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је 2006. године. Завршни рад на тему „Производња протеаза из *Candida utilis* применом технике гајења на чврстим подлогама” под менторством проф. др Зорице Кнежевић-Југовић одбранила је 24. септембра 2010. године са оценом 10 (десет), чиме је стекла звање дипломирани инжењер технологије. Мастер академске студије, на истом факултету, у оквиру студијског програма Биохемијско инжењерство и биотехнологија, профил Биохемијско инжењерство уписала је школске 2010/2011 године. Завршни мастер рад на тему „Ензимска синтеза етил-цинамата у реактору са флуидизованим слојем“ под руководством ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић одбранила је 15. јула 2011. године са оценом 10 (десет) и просечном оценом током студирања 9,25 (девет и 25/100), чиме је стекла звање мастер инжењер технологије. Докторске студије, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, уписала је школске 2011/2012. године. Положила је све испите предвиђене наставним планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,55 (девет и 55/100) укључујући и Завршни испит са оценом 10 (десет).

Од марта 2012. године као стипендиста-докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја ангажована је на пројекту из програма интегралних и интердисциплинарних студија, област Биотехнологија под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (евиденциони број ИИИ 46010). Запошљава се на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду у оквиру наведеног пројекта, ИИИ 46010, 1. априла 2015. године. У звање истраживач сарадник први пут је изабрана је 8. јуна 2015. године, а 6. јула 2018. године усвојено је решење о реизбору у ово звање. У току докторских студија поред ангажовања на пројекту из области интегралних и интердисциплинарних истраживања (ИИИ 46010), ангажована је и на иновационом пројекту: „Иновативни поступци производње функционалних производа на бази жита обогаћених неалергеним протеинима и биоактивним пептидима“ (Иновациони пројекат, 2017-2018), којим руководи проф. Зорица Кнежевић-

Југовић. Такође, Јелена Јовановић ангажована је и учествује у реализацији два међународна научно-истраживачка пројекта и то један ЕУРЕКА пројекат под називом „Design of novel enzyme-based technologies for structuring and processing of soy proteins“ (br. E!9936 – SOYZYME, 2017-2019. године) и билатерални пројекат „Integrated pulsed electric field extraction and lactic acid bacteria fermentation for the production of micro algal extracts fortified with probiotics (PEF4AlgBiotics)“, (Република Србија и Deutcher Akademischer Austauschdienst – DAAD, 2017-2018. године).

Као први аутор и коаутор објавила је укупно два рада у међународном часопису изузетних вредности (M21a), два рада у врхунском међународном часопису (M21), пет рада у истакнутим међународним часописима (M22), три рада у међународном часопису (M23), два рада у водећем часопису националног значаја (M51), један рад у истакнутом часопису националног значаја (M52), двадесетпет саопштење на скуповима и то: осам радова саопштених на међународном скупу штампана у целини (M33), три рада саопштена на националном скупу штампана у целини (M63), дванаест радова саопштених на међународном скупу штампана у изводу (M34) и два рада саопштена на националном скупу штампана у изводу (M64). Исто тако, као коаутор објавила је поглавље у монографији међународног значаја (M13).

Од септембра 2015. године, уз сагласност Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Јелена Јовановић ангажована је у настави у извођењу експерименталних вежби из предмета: Биотехнолошки практикум II (профил БИБ) и Ензимско инжењерство (профил ФИ) на основним академским студијама. У периоду од 2013. године до данас непосредно је учествовала у изради, организовању и извођењу укупно 26 завршних и мастер радова студената студијског програма Биохемијско инжењерство и биотехнологија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

## 2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација **Јелене Р. Јовановић**, мастер инж. технологије, написана је на 338 страна, са укупно 9 поглавља, 68 слика, 24 табеле и 387 литературних навода. Докторска дисертација састоји се из следећих поглавља: *Увод*, *Теоријски део*, *Експериментални део*, *Резултати и дискусија*, *Закључак* и *Литература*, уз изводе на српском и енглеском језику. На почетку дисертације дат је Резиме на српском и енглеском језику, а на крају дисертације налази се Биографија и три обавезна Прилога: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије рада и Изјава о коришћењу.

### 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У *Уводу* је дат кратак осврт на област истраживања, дефинисан је предмет истраживања и актуелност проблематике у свету, као и главни циљеви дисертације. Дата су основна разматрања о значају протеина беланцета, пре свега њихових хидролизата и изолованих фракција пептида посматрана кроз њихова биолошки активна својства, са посебним освртом на неопходност примене одговарајућег неинвазивног претретмана у циљу побољшавања биолошких активности, као и потенцијалне примене хидролизата и/или фракција пептида у различитим областима, нарочито као компонената функционалне хране. Акцент је стављен на предност примене ултразвучног поступка третирања нативних протеина беланцета пре ензимске хидролизе, при чему је посебна пажња посвећења утицају овог третмана не само на ефикасност ензимског поступка, већ и на удео пептидних фракција и њихове биолошке активности. На крају *Увода* представљени су циљеви рада и план истраживања.

*Теоријски део* састоји се од четири потпоглавља и то: 1) *Протеини беланцета*; 2) *Биолошка активност протеинских фракција и/или пептида беланцета*; 3) *Ензимска*

хидролиза протеина и 4) *Изоловање и карактеризација пептида протеина беланцета применом различитих сепарационих техника*. У потпоглављу *Протеини беланцета* описана су основна физичко-хемијска својства протеина беланцета од значаја за њихову примену као додатака функционалној храни и/или нутрицеутика, при чему су структура и својства основних, као и мање заступљених, протеинских фракција беланцета детаљно описане. Беланце као извор протеина је неретко коришћен супстрат захваљујући свом јединственом аминокиселинском саставу и високој нутритивној вредности, а чини га смеша више од тридесет различитих протеина међу којима је најзаступљенији овалбумин. Протеини беланцета садрже све есенцијалне аминокиселине неопходне за нормално одвијање метаболизма, нарочито је висок садржај аминокиселина са сумпором. Међутим, његова примена као протеинских суплемената, нарочито у случају дијететских формулација је ограничена услед алергености, нестабилности, промене структуре под утицајем фактора животне средине и недовољно изражене биолошке активности.

У наставку, у потпоглављу *Биолошка активност протеинских фракција и/или пептида беланцета* детаљно су разматрана основна биолошки активна својства протеина и/или пептида, при чему је посебан осврт дат на појединачна својства попут антиоксидативне, антипролиферативне, антихипертензивне и антимицробне активности и до сада истражену везу између дужине и секвенце пептида са њиховом потенцијалном биоактивношћу. Биолошки активним пептидима сматрају се протеински фрагменти који су неактивни унутар секвенце иницијалног (нативног) протеина, а који се могу ослободити из протеина на више начина, при чему се у оквиру истражавања ове дисертације разматра само парцијална и контролисана ензимска хидролиза применом ендо- и егзо-пептидаза. За биолошки активне пептиде интересантно је да њихова величина износи између 5 и 16 аминокиселина, а молекулска маса до 6000 Da. Ови пептиди поседују различите биолошке активности и лакше се интестинално апсорбују јер су боље растворни и мањих су димензија од полипептида и нативних протеина. Молекулска маса и структурне карактеристике, као што је хидрофобност, утичу на главне транспортне путеве код пептида. Са друге стране, што је молекулска маса пептида већа, то се смањује његова шанса да прође интестиналне баријере. Зато, наглашено је да је у случају протеинских фракција и њихових хидролизата степен хидролизе пептидних веза један од најважнијих параметара. Присуство биолошки активних ди-, три- и олигопептида, ослобођених током парцијалне хидролизе ендо-пептидазама, будући да су изузетно растворљиви, омогућава њихову успешну имплементацију, како у виду смеше тако и појединачних, у најразличитије прехранбене производе. Са друге стране, наведени су неки од примењених поступака и примера из литературе који су довели до биолошки активних својстава протеина и/или пептида беланцета, пре свега антиоксидативне, антихипертензивне и антипролиферативне. Прегледно, у виду табеле, приказане су неке од до сада идентификованих и објављених секвенци биолошки активних пептида добијених из протеинских фракција беланцета и њихових хидролизата. Велики број доступних научних студија, које су спроведене како би се добли хидролизати или биоактивни пептиди из протеинских фракција беланцета са антиоксидативним, антипролиферативним и антихипертензивним дејством, описане су у овом потпоглављу.

Са аспекта посматрања и анализирања биолошких својстава пептида, у студијама се истиче да поред породичне склоности ка обољењу од одређене врсте карцинома, најчешћи узрок болести су оксидативни стрес и неправилна, нездрава исхрана. Наглашено је да вишак слободних радикала може проузроковати одвијање различитих оксидативних реакција, које пак могу довести до оштећења ћелија и/или њихових делова. Као такав, оксидативни стрес и слободни радикали сматрају се иницијаторима и/или пропагаторима болести попут кардиоваскуларних болести, упалних процеса, канцера и дијабетеса. Зато је успоравање оксидативних процеса у ћелијама услед узимања различитих дијететских суплемената или у храни услед додатака различитих природних и синтетских антиоксиданаса од посебног значаја. Тачан механизам антиоксидативне и других активности пептида још увек није у потпуности разјашњен, али многобројне студије показују да су они инхибитори липидне

пероксидације, инхибитори тзв. „хватачи“ слободних радикала и хелатори прелазних метала. Генерално њихова антиоксидативна, антимикробна и антихипертензивна својства се повезују једино са њиховим аминокиселинским саставом, који у великој мери одређује њихову структуру и степен хидрофобности. Тако на пример, пептиди који у својој секвенци садрже аминокиселинске остатке Trp, Trp, Met, Lys, Cys, и His показују антиоксидативну активност, будући да имају ароматични остатак који може да донира протоне радикалима, док се антиоксидативна активност пептида који садржи His огледа у донирању атома водоника, инхибицији пероксил радикала и способности хелирања јона метала. Студије наводе да SH група цистеина има кључну улогу у антиоксидативној активности услед директне интеракције са радикалима. Међутим, поред аминокиселинског састава, велики утицај на биолошка својства има и њихова секвенца, при чему је у истраживањима показано да је за нпр. антиоксидативну активност неких пептида кључно присуство His-His сегмента на С-терминалном крају, док пептиди са врло снажном инхибиторном ACE-активношћу поседују аминокиселине Pro, Phe или Trp на С-терминалном крају, а на N-терминалном крају Val и Ile. Са друге стране, позитивно наелектрисање биоактивних пептида сматра се веома важним за бактерицидно деловање према Грам-негативним сојевима (*Escherichia coli*), који у саставу ћелијске мембране имају негативно наелектрисане липополисахариде, док се претпоставља да хидрофобност и негативно наелектрисање пептида омогућује интензивно деловање на раст Грам-позитивних сојева као што је *Staphylococcus aureus*.

У потпоглављу *Ензимска хидролиза протеина* представљене су теоријске основе ензимске хидролизе протеина заједно са главним проблемима који се јављају током хидролизе. Наведене су предности ензимске хидролизе у поређењу са микробиолошким и хемијским поступцима за унапређење биолошких својстава протеина попут благих реакционих услова, смањеног образовања споредних производа и добијања необојених хидролизата бољег квалитета, али и недостаци због којих је примена ових поступака још увек ограничена у већим размерама. Дефинисане су најчешће коришћене методе за одређивање степена хидролизе, као и фактори који утичу на саму брзину ензимске хидролизе протеина. Представљене су протеазе које се користе у процесу хидролизе, као и њихова класификација, основна каталитичка својства, специфичност и механизми деловања. Детаљно је описана структура и специфичност деловања четири протеазе које су коришћене као биокатализатори у оквиру ове дисертације.

Како је ензимска хидролиза процес чији је механизам сложен, наведени су различити кинетички модели из литературе који су с екористили за математичко описивање хидролизе различитих протеина са протеазама различите специфичности и механизма деловања. У наставку је посебан осврт дат на механизам деловања ултразвучних таласа, са аспекта претретирања протеина, с обзиром да је приликом извођења ензимског поступка хидролизе нативних протеина беланцета доступност пептидних веза у унутрашњости молекула дејству протеолитичких ензима смањена. Контролисаним деловањем ултразвуком високог интензитета у интервалу фреквенци од 16 до 100 kHz, доприноси се унапређењу ензимског процеса услед промене конформације молекула протеина. Ова технологија може бити врло корисна при минималном процесирању протеина, јер се ограничава повишење температуре током третмана, чиме се омогућава очување сензорних и нутритивних својстава протеина. Детаљно је описан механизам деловања ултразвучних таласа, при чему је истакнуто да је пренос акустичне енергије кроз протеински супстрат брз и целовит, чиме се омогућава редуција укупног времена обраде и смањује потрошња енергије. Када се путем третирања протеина ултразвуком унесе тачно дефинисана, оптимална, количина топлотне и механичке енергије, добијају се обрађени протеини растворљиви у води који су лакше доступни дејству протеолитичких ензима и код којих долази до потпуног или делимичног размотавања полипептидних ланаца и већег излагања остатака аминокиселина Phe, Trp и Trp полипептидног ланца из унутрашњости молекула. С обзиром да се ултразвучним третманом може поспешити ослобађање хидрофобних аминокиселинских остатака, истакнут је значај феномена кавитације са аспекта хемијских, физичких и физичко-хемијских промена

ултразвучно третираних узорака и дат је преглед најзначајних фактора који утичу на кавитацију.

У последњем потпоглављу *Изоловање и карактеризација пептида протеина беланцета применом различитих сепарационих техника* наведене су предности и недостаци ултрафилтрације као ефикасне технике за пречишћавање и изоловање фракција пептида из хидролизата нативних протеина добијених контролисаним и парцијалним ензимским процесом. Молекулска маса представља важан параметар који се одражава на ензимску хидролизу протеина, што је додатно у корелацији са биолошком активношћу протеинских хидролизата. Стога, дат је и увид у ефикасне методологије фракционисања пептида са циљем побољшања њихових биолошки активних својстава. С тим у вези, детаљно је описано ултрафилтрационо раздвајање протеинских хидролизата коришћењем различитих ултрафилтрационих јединица и мембрана различитих величина пора, најчешће целулозних, као и ефекат концентрационе поларизације на сепарацију и дате су теоријске основе важне за ултрафилтрацију макромолекула као што су протеини. Корисна и ефикасна примена мембранских технологија, као што је ултрафилтрација даје полазну основу за развој ензимских мембранских реакторских система који омогућавају истовремено одигравање ензимског процеса и сепарације настали пептида. Најчешће се користе полимерне мембране, јер се добијају у најразличитијим облицима и лако се модификују. Основне карактеристике ових мембрана су хемијски састав, распоред и величина пора, дебљина и отпорност на притисак и различите температуре. Такође, у мембранским реакторима могуће је ензимску хидролизу изводити континуално као и остварити велику граничну површину за одвијање реакције применом порозних мембрана или оних у облику шупљих влакана.

Прегледом доступне савремене литературе за процесе хидролизе протеина из природних сировина издвојена су два мембранска реакторска система као решења за успешнију хидролизу. Први систем, мембрански реактор са протеазом имобилисаном у порама мембране наметнуо се као ефикасан систем за рецикулацију протеолитичких ензима и поуздану контролу степена хидролизе и састава хидролизата. На тај начин, омогућено је лако заустављање реакције без термичког третирања биокатализатора просто уклањањем мембране, рециклација ензима и одвијање реакције и сепарације производа од ензима у истој јединици, али не и међусобно раздвајање хидролизата на појединачне фракције. Код проточног реактора са мешањем са мембранским модулом, ензимски реактор и мембрански модул су две одвојене јединице што усложњава технолошки процес и повећава ризик од контаминације. Код ових реактора, протеазе нису имобилисане у мембрани, већ су слободне у раствору, док мембрана служи за раздвајање производа мале молекулске масе од ензима и недовољно хидролизованог производа веће молекулске масе. Међутим велика предност оваквог процеса је у томе што се хидролизат може раздвојити у различите фракције на основу молекулске масе производа. Тако, пажљивом оптимизацијом величина пора мембране ултрафилтрационе јединице могу се добити хидролизати са олигопептидима веома уског распона молекулске масе, односно жељених биолошких својстава.

У наставку, дефинисане су најчешће коришћене хроматографске технике за раздвајање и изоловање биоактивних пептида из фракција, са посебним акцентом на гел-филтрациону хроматографију и реверзно фазну хроматографију под високим притиском (RC-HPLC), представљене су њихове важне карактеристике и дат је јасан увид њихове примене у случају изоловања биоактивних пептида протеина беланцета.

У поглављу *Материјали и методе* наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, а затим су наведене методе коришћене у току експерименталног рада и обраде резултата. Прво су описани услови и методе процесирања протеина беланцета ултразвучним таласима генерисаним посредством уређаја различите конструкције. Потом су описани начини извођења ензимске реакције хидролизе протеина беланцета са аспекта једноступеног и двоступеног ензимског поступка у шаржном реактору са механичким

мешањем и/или у континуалном реактору повезаним са мембранском сепарационом јединицом. Детаљно су описане конфигурације биореактора у којима је вршена реакција хидролизе, као и сепарационе технике коришћене у циљу изоловања фракција пептида. Конкретно, технике мембранске сепарације за раздвајање хидролизата протеина беланцета на фракције на основу величине молекула (ултрафилтрација), као и методе одређивања величине протеинских фракција (SDS-PAGE електрофорезом и/или гел-филтрационом хроматографијом) детаљно су описане. У овом поглављу описане су и процедуре за одређивање утицаја дејства ултразвучних претретмана на нативне протеине беланцета, као што су површинска хидрофобност, садржај сулхидрилних група, расподела величине честица, полидисперзни индекс и промена укупног наелектрисања.

С обзиром да је један од основних циљева израде ове докторске дисертације био изоловање и карактеризација биоактивних пептида из сложене смеше нативних протеина беланцета претретираних ултразвуком, од изузетно важности било је тестирање биолошких активности *in vitro* методама. Стога, у овом поглављу описани су поступци за одређивање антиоксидативне активности хидролизата и/или фракција пептида и то: 1) способност неутрализације 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала (DPPH<sup>•</sup>); 2) способност неутрализације радикалног катјона 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS<sup>•+</sup>); 3) метода инхибиције супероксид радикала, 4) способности хелирања јона метала, 5) способност инхибиције липидне пероксидације на моделу пероксидације линолне киселине и 6) способност инхибиције липидне пероксидације на моделу пероксидације емулзије β-каротен–линолна киселина.

Затим, описан је поступак одређивања антипролиферативне активности хидролизата и/или фракција пептида тестирањем инхибиције пролиферације две туморске ћелијске линије: MCF-7 (хумана ћелијска култура аденокарцинома дојке) и SW480 (хумана ћелијска линија колоректалног аденокарцинома). Испитивања инхибиторног дејства на пролиферацију туморских ћелија MCF-7 и SW480 хидролизата и/или фракција пептида извршена су колориметријским МТТ тестом, који се заснива на редукцији жуте тетразолијумове соли (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид–МТТ). У складу са циљевима ове дисертације процедуре за одређивање других важних биолошких својстава хидролизата и/или пептида детаљно су описане и то: 1) поступци одређивања антимицробне активности према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријским сојевима и ћелијама култура квасаца методом дифузије на агарној подлози, 2) поступак одређивања антихипертензивне активности коришћењем супстрата хипурил-хистидил-леуцин и ангиотензин-конвертујућег ензима изолованог из плућног ткива зеца и 3) поступци одређивања антикоагулативне активности који су подразумевали мерење времена коагулације рекалцификоване плазме.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду при изради ове дисертације, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са резултатима добијеним у радовима из литературе у сличним испитаним системима. У овом поглављу налази се укупно 9 потпоглавља и то: 1) Ензимска хидролиза протеина беланцета у шаржном реактору са механичким мешањем; 2) Кинетичка студија ензимске хидролизе протеина беланцета; 3) Ултрафилтрационо фракционисање хидролизата нативних протеина беланцета; 4) Антиоксидативна активност изолованих фракција пептида из нативних протеина беланцета; 5) Антипролиферативна активност изолованих фракција пептида из нативних протеина беланцета; 6) Антимицробна активност изолованих фракција пептида из нативних протеина беланцета; 7) Антихипертензивна и антикоагулативна активност изолованих фракција пептида из нативних протеина беланцета; 8) Пречишћавање и карактеризација изолованих фракција пептида беланцета; 9) Производња биоактивних пептида у мембранском реактору са рецикулацијом и њихова карактеризација.

У првом потпоглављу приказани су резултати оптимизације ензимске хидролизе протеина беланцета у шаржном реакторком систему са аспекта испитивања утицаја рН вредности нативних протеина беланцета, интензитета и параметара ултразвучног претретмана на ток ензимске хидролизе и укупну антиоксидативну активност добијених хидролизата. Констатовано је да повећање рН вредности протеина беланцета позитивно утиче на брзину ензимске реакције хидролизе, као и њен дањи ток, и да је при рН 9,20 (беланце без подешавања алкалности) забележен висок равнотежни степен хидролизе  $29,9 \pm 1,76\%$ , за разлику од нижиш рН вредности. Показано је да је ултразвучним претретманом у киселој средини, услед промене расподеле наелектрисања и конформације молекула протеина, супстрат постао мање подложен дејству протеолитичког ензима алкалазе, па је самим тим остварена делимична хидролиза, а настали полипептиди нису испољили значајну способност неутралисања  $\text{DPPH}^\bullet$  радикала. Највећи степен неутралисања  $\text{DPPH}^\bullet$  радикала уочен је код хидролизата произведеног од полазног узорак беланцета чија је рН износила 8,6 ( $34,6 \pm 1,44\%$ ). Почетна брзина ензимске реакције и степен хидролизе значајно су варирали у зависности од дужине трајања и интензитета ултразвучног претретмана, а ултразвучни претретмани утицали су на промену тока ензимске реакције за све испитане дужине трајања претретмана, с тим што су знатно већи степени хидролизе и почетне брзине остварени након 10 и 15 минута у поређењу са контролним узорком. Ултразвучни претретман изведен сондом ( $20 \pm 0,2$  kHz) у дужини трајања 15 минута, при мањој фреквенци и знатно вишем интензитету у поређењу са ултразвучним купатилом ( $40 \pm 2$  kHz) довео је до веће конформационе покретљивост молекула протеина беланцета и вишој доступност ензимској хидролизи. Хидролизат ултразвучно претретраних протеина беланцета добијен у једноступеном поступку хидролизе са алкалазом показао је највећу редукујућу моћ и степен неутралисања  $\text{DPPH}^\bullet$  радикала у поређењу са свим осталим тестираним хидролизатима. Свеукупним сагледавањем вредности остварених брзина ензимске реакције, степена хидролизе и антиоксидативне активности, једноступена хидролиза беланцета у шаржном реактору са мешањем катализована алкалазом, и двоступена ензимска хидролиза катализована алкалазом и флеворзимом, усвојене су као најефикасније, те су оне коришћене у даљем експерименталном раду.

У потпоглављу *Кинетичка студија ензимске хидролизе протеина беланцета* приказани су кинетички резултати хидролизе ултразвучно претретраних протеина беланцета у једноступеном поступку са алкалазом и двоступеном поступку са комбинацијом алкалазе и флеворзим, при различитим почетним концентрацијама протеина и ензима, као и температуре реакције. Експериментално добијени резултати оба ензимска поступка моделовани су полу-емпиријским кинетичким моделом који узима у обзир инхибицију супстратом у вишку и дезактивацију ензима у складу са кинетиком другог реда у току времена. Из емпиријске једначине усвојеног кинетичког модела, одређене су кинетичке константе методом линеарне регресије. Показано је да смањење инхибиције ензима супстратом, као и повећање активности ензима и брзине реакције указују на побољшање ензимске хидролизе протеина беланцета након оба ултразвучна претретмана, чиме је и квантитативно доказан позитиван ефекат ултразвучних претретмана. Термодиманичком анализом утврђено је да се вредности промене ентропије ( $\Delta S$ ) повећавају са порастом температуре реакције хидролизе како за ултразвучно претретране, тако и за термички претретране протеине беланцета, и да је након претретмана раствор протеина беланцета уређенији и ближи равнотежном стању. Резултати испитивања утицај процеса соникације на карактеристике честица протеина беланцета са аспекта расподеле величине честица, површних карактеристика као што су укупно наелектрисање, тј. зета ( $\zeta$ )-потенцијал и површинска хидрофобност, као и на степен денатурације протеина на основу односа количине укупних и реактивних сулфхидрилних (SH) група, квантитативно су показали да су таласи индуковани ултразвучном сондом довели до промене структуре протеина беланцета и делимичне денатурације чинећи полипептидне ланце приступачније дејству ендо-пептидазе алкалазе. Резултати су били потпуно у сагласности са кинетичким резултатима јер је



ултразвучни третман допринео повећању брзину ензимске реакције, узрокујући и повећање укупне површинске хидрофобности, садржаја реактивних SH група и повећање вредности  $\zeta$ -потенцијала. Упоредо са повећањем садржаја SH група забележено је смањење средње величине агрегата протеина беланцета и промена расподеле величине агрегата.

У потпоглављу *Ультрафилтрационо фракционисање хидролизата нативних протеина беланцета* најпре је одређена корелација између степена хидролизе и антиоксидативне активности, како би се нутритивно вредни хидролизати протеина беланцета тачно дефинисаних степена хидролизе, односно састава полипептидних ланаца могли успешно одвојити на биолошки најактивне фракције пептида. Највеће антиоксидативне активности оставрене су током 60, 90 и 90 минута са вредностима степена неутралисања АБТС<sup>•+</sup> радикалског катјона  $77,17 \pm 1,03$ ,  $75,89 \pm 1,14$  и  $74,78 \pm 1,11\%$  за хидролизате протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом, у ултразвучном купатилу и високом температуром, редом. Процењено је да су наведене вредности антиоксидативне активности постигнуте су за степене хидролизе  $\sim 28\%$  и да је управо при овом степену хидролизе протеина беланцета алкалазом постигнут посебан састав ослобођених полипептида и олигопептида. На основу представљене расподеле молекулских маса, извршено је ултрафилтрационо раздвајање хидролизата припремљених са степеном хидролизе до  $28\%$  на мембранама различитих величина пора (30, 10, 30 и 1 kDa). На основу добијених резултата утврђено је да је масени удео изолованих пептида у опсегу маса 1-3 и 3-10 kDa добијених ултразвучним третманом два пута већи од удела изолованих пептида са термичким третманом.

У наредна *четири потпоглавља* изоловане фракције пептида из хидролизата нативних протеина беланцета, претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, сакупљене су и извршена је њихова карактеризација са аспекта различитих биолошких својстава, али је проучен и синергизам биолошких активности хидролизата нативних протеина беланцета и њихових изолованих биоактивних пептида чиме је дат значајан допринос у разумевању механизма деловања биоактивних пептида, као и проналажењу корелације дужина и секвенца пептида и њихове биолошке функције. Корелација између структуре пептида и биолошке функције протеинских хидролизата и/или изолованих фракција пептида није потпуно позната, али се сматра да зависи од неколико карактеристика: секвенце аминокиселина, молекулске масе пептида, хидрофобности, наелектрисања и својства основних аминокиселина.

Најпре су изоловане фракције пептида окарактерисане одређивањем и поређењем антиоксидативне активности сваке од њих, при чему се водило рачуна о утицају састава и величине пептида на способност неутралисања слободних радикала. Утврђено је да зависно од степена биорасположивости, врсте и састава, пептиди протеина беланцета могу понудити одређени ниво заштите ћелијама против токсичних ефеката реактивних кисеоничних врста и јона прелазних метала, при чему се фракције молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, издвају као оне са највишим нивоима инхибиције слободних радикала (преко  $70\%$  при концентрацији пептида  $1-1,2 \text{ mg/cm}^3$ ). Детаљније, ове две фракције поседују изузетне способности супресије слободних радикалских група као што су АБТС<sup>•+</sup> радикалски катјон, хидроксил радикал и супероксид анјон радикал, али и липидне пероксидације и степена хелирања  $\text{Fe}^{2+}$  јона. На основу корелације свих антиоксидативних активности, претпостављено је да фракција-3 (3-10 kDa) и фракција-4 (1-3 kDa), обилују високим садржајем ароматичних и хидрофобних аминокиселина, пре свега Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp, Pro и Val, али није искључиво да можда једна од њих садржи већи садржај хистидина. Добијени резултати показују да су сви испитани узорци како хидролизата протеина беланцета тако и изоловане пептидне фракције додати у липидну емулзију  $\beta$ -каротен-линолна киселина били изузетно способни да инхибирају формирање пероксил радикала током 120 минута инкубације у поређењу са контролним узорком нативног нетретираниог беланцета, чиме је структура  $\beta$ -каротена остала очувана, а оксидација  $\beta$ -каротена, која се манифестује обезбојавање реакционе смеше, је инхибирана. Фракције пептида молекулске масе мање од 3 kDa, међу анализираним

узорцима, испољиле су највећу способност инхибирања пероксил радикала, односно оксидација  $\beta$ -каротена је најмања. Хидролизат је био инфериорнији од фракције-4 и фракције-5, и испољио је антиоксидативну активност сличну оној у фракцији-3, што је у сагласности са резултатима других антиоксидативних тестова, по којима се управо фракција-3 и фракција-4 издвајају као најактивније. Због тога активности пептида са аспекта неутрализације слободних радикала може се повезати са инхибицијом оксидације линолне киселине, како су ситему са линолном киселином тако и у систему  $\beta$ -каротен-линолна киселина.

На основу целокупних резултата антитуморске активности хидролизата нативних протеина беланцета и изолованих фракција пептида, као и увида у свега неколико студија које разматрају антитуморско дејство хидролизата протеина беланцета и то само изолованих протеинских фракција, показани антипролиферативни ефекат два ензимска хидролизата и две пептидне фракције молекуле масе 3-10 kDa зависи од типа туморске ћелије линије, примењене концентрације пептида и времена инкубације. Као најизражајнији ефекат на ћелијске линије аденокарцинома дојке (MCF-7) и колоректалног аденокарцинома (SW480) издаваја се управо онај антипролиферативан ефекат који су испољили узорци изолованих ултрафилтрационих фракција пептида, у којима су нативни протеини беланцета непосредно пре ензимске хидролизе били подвргнути ултразвучном третману фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz. Нарочито је изражена инхибиција пролиферације при концентрацијама узорака протеинских хидролизата и фракције пептида од  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  и инкубацији од 72 сата за хумане ћелије аденокарцинома MCF-7 и SW480. Слично слагање је показао и протеинских хидролизат код кога су протеини беланцета претретирани у ултразвучном купатилу. У испитивањима цитотоксичног ефекта ових узорака на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перодонталног лигамента у одабраном распону концентрација и времена инкубације, утврђено је да оба ензимска хидролизата ултразвучно претретираних протеина беланцета и њихове фракције пептида молекуле масе 3-10 kDa не испољавају инхибиторни ефекат. Резултати указују да анализирани узорци пептида, како у смеси тако и у облику фракција, немају токсичан ефекат на здраве матичне ћелије, што је од изузетне важности за формулисање функционално активних пептида/протеина садржаних у финалном дијететском производу.

Потом, покушао је да се успостави корелација између антиоксидативне и антипролиферативне активности и утврђено је да је она линеарна и да порастом антиоксидативне активности са аспекта неутрализације  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  радикалног катјон, линеарно расте антипролиферативна активност. Пирсонова корелациона анализа показала је значајну позитивну корелацију антипролиферативне активности фракција пептида молекуле масе 3-10 kDa, изолованих из хидролизата протеина беланцета соничираних ултразвуком фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, и њихове антиоксидативне активности у случају обе туморске ћелијске линије. То подразумева да је за висок степен инхибиције пролиферације ћелија аденокарцинома дојке и колоректалног аденокарцинома неопходно присуство пептида који уједно испољавају и високу антирадикалску активност, а повезаност слободних радикала и оксидативног стреса ћелија са пролиферацијом туморских ћелија је велика.

Антимикробна активност пептида протеина беланцета у оквиру ове дисертације показује да изоловани пептиди како из хидролизата тако и из ултрафилтрационих фракција не поседују инхибиторну активност према ћелијама квасца *Candida albicans*, али да испољавају антибактеријску активност, нарочито према патогеној Грам-позитивној *Staphylococcus aureus* за коју је познато да узрокује тровање храном, као последица конзумирања хране која је загађена ентеротоксинима. Изоловане пептидне фракције показале су слабу инхибиторну активност према испитаном соју *Escherichia coli*. Ултразвучним претретманом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz протеина беланцета и њиховом субсеквентном хидролизом алкалазом, као и применом ултрафилтрације значајно је повећана антимикробна активност у поређењу са нативним нетретираним беланцетом, при чему се претпоставља да пептиди, груписани у

оквиру једне фракције тачно дефинисаног састава и величине пептидних секвенци, лакше дифундују кроз ћелијску мембрану Грам-позитивних бактерија у течном медијуму и на тај начин испољавају бактериостатичко и/или бактериоцидно дејство.

Резултати испитивања антихипертензивне активности показују да изоловани пептиди како из хидролизата, тако и из ултрафилтрационих фракција јако инхибирају АСЕ-активности. Међу резултатима добијених применом различито генерисаних ултразвучних таласа различите фреквенце није забележена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у вредностима степена инхибитроне активности, али је интересантно запажање да је приликом одређивања њихове концентрације потребне за инхибирање 50% АСЕ-активности ( $IC_{50}$ ) забележена и те како значајна разлика ( $p < 0,05$ ).  $IC_{50}$  вредности износиле су  $67,85 \pm 1,29$  и  $76,68 \pm 1,31 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  за ултразвучни претретман фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, редом, чиме је утврђено да је ипак неопходна знатно већа концентрација оних пептида ослобођених претретирањем нативних протеина у ултразвучном купатилу. Међутим, антикоагулантна активност хидролизата и/или изолованих фракција пептида, која је обухватила мерење времена коагулације рекалцификоване плазме, била је знатно нижа од оних вредности добијених са аспирином концентрације 0,4 mM, који се конвенционално користи у антикоагулантној терапији.

Свеукупним резултатима испитивања биолошких активности у ова четири потпоглавља, показано је да конвенционални термички претретман протеина, који је обично заступњен у индустријској пракси, значајно доприноси смањењу биолошке активности пептида протеина беланцета услед њихове нестабилности и да је потреба за његовом заменом мање инвазивним техникама, као што је технологија ултразвука, сасвим оправдана.

У потпоглављу *Пречишћавање и карактеризација изолованих фракција пептида беланцета* применом гел-филтрационе хроматографије, биолошки најактивније фракције пептида молекулске масе 3-10 kDa даље су раздвојене на неколико фракција, које су окарактерисане са аспекта антиоксидативне активности. Том приликом је утврђена способност неутрализације  $ABTS^{+}$  радикалског катјон у изолованим фракцијама, али је такође утврђена разлика у расподели величине пептида и њихових секвенци код узорака третираних ултразвуком фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz. На основу резултата степена хидрофобности површине молекула пептида у изолованим фракцијама и антиоксидативне активности, потврђено је да највећу хидрофобност поседују управо фракције са најизраженијим биолошким активностима, и то је фракција-3 (3-10 kDa) и фракција-4 (1-3 kDa). Ово је у складу са литературним резултатима добијеним на модел пептидима синтетисаним из аминокиселина са хидрофобним бочним низовима попут фенилаланина и триптофана, који су показали снажну антиоксидативну активност одређену помићу неколико метода. Резултатима из овог поглавља потврђена је и успостављена релација и између фракција пептида тачно дефинисаних молекулских маса и понаособ једне од биолошких активности.

У потпоглављу *Производња биоактивних пептида у мембранском реактору са рецикулацијом и њихова карактеризација* у циљу добијања биолошки најактивнијих фракција пептида у континуалном систему, приказани су резултати оптимизације начина извођења процеса и конфигурације мембранског реакторског система са рецикулацијом. Као биокатализатор коришћена је протеаза из *Bacillus licheniformis* (алкалаза), а нарочито је испитан утицај ултразвучног претретмана на продуктивност процеса и принос биоактивних пептида и у овом систему. Упоредени су резултати кинетичких параметара у шаржном и мембранском систему, као и резултати антиоксидативне активности добијених фракција пептида. Постигнута је висока продуктивност и принос пептида са антиоксидативном активношћу у мембранском реактору са рецикулацијом, тако да се континуална производња пептидних фракција хидролизата показала као ефикасна.

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

У поглављу *Литература* дат је списак коришћене литературе.

### 3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

#### 3.1. Савременост и оригиналност

Биоактивни пептиди су због своје мале молекулске масе и лаке апсорпције нашли велику примену као имунорегулатори, антихипертензивни и антимикробни пептиди, али и као антиоксиданти. Ови пептиди садрже најчешће 5-16 аминокиселинских остатака и њихова активност се испољава кроз различите механизме. Присуство и правилан положај базних и/или киселих, ароматичних и хидрофобних аминокиселинских остатака у оквиру пептидне секвенце може да доведе до побољшања биолошких активности пептида. Ово је могуће постићи парцијалном и контролисаном ензимском хидролизом нативних протеина при чему се ослобађају специфични ди-, три- и олигопептиди који имају антиоксидативну, антипролиферативну и антихипертензивну активност због чега се добијени хидролизати, полупроизводи, могу користити као нови биоактивни суплементи. Накнадно, из њих се могу применом различитих сепарационих техника изоловати и пречистити пептиди, одредити њихова пептидна секвенца и извршити карактеризација са аспекта различитих биолошких активности. Прегледом доступне литературе као главни проблем имплементације биолошки активних пептида намеће се њихова нестабилност и промена хемијске структуре услед термичке обраде, која последично доводи и до промене биолошке активности. Негативни пропратни ефекти које испољава термички претретман беланцета на високим температурама огледају се у одвијању сложене Мајлардове и других реакција, које доводе до тамњења производа и настајања једињења са токсичним, мутагеним и тератогеним ефектима. Осим тога, приликом термичког поступка у благо алкалној средини долази до неселективне и неконтролисане хидролизе протеина, као и њихове иреверзибилне денатурације, тако да се значајно смањује и нутритивна вредност производа. Зато, процес производње ових нестабилних биоактивних пептида чији је развој уједно и предмет истраживања ове докторске дисертације, захтева коришћење иновативних технологија нпр. ултразвука високог интензитета, које ће омогућити задржавање биолошке активности без образовања нежељених ефеката.

Утицај ултразвука на ензимску хидролизу протеина беланцета, као и на профил и биолошку активност пептида није довољно истражен, али се истиче да технологија ултразвука као брза, поуздана и ефикасна техника може потпомоћи ензимску хидролизу, као и ослобађање биолошки активних пептида. У овој докторској дисертацији проучава се ензимски поступак производње биолошки активних пептида ултразвучно претретираних нативних протеина беланцета са аспекта њиховог изоловања и карактеризације. Као супстрат, захваљујући свом јединственом аминокиселинском саставу и високој нутритивној вредности, изабрано је нативно беланце које чини смешу више од тридесет различитих протеина међу којима је најзаступљенији овалбумин. Сам ензимски поступак оптимизован је применом различитих ендо-и егзо-пептидаза, док је ултразвучни претретман испитан применом ултразвука различите фреквенце ( $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz) и механизма деловања водећи рачуна о врсти и конструкцији уређаја за генерисање ултразвука, као и дужини трајања самог претретмана. Међутим, током извођења претретмана ултразвуком неопходно је задовољити и захтеве који се односе и на очување функционалних, реолошких и нутритивних својстава добијених хидролизата и/или фракција пептида из протеина беланцета и унапређење биолошких активности како би се биоактивни пептиди могли инкорпорирати у одређене водене и двофазне модел системе хране као функционални

додачи. Наиме, сувише интензиван третман ултразвуком може да доведе до интермолекулских интеракција након развијања молекула протеина, а услед тога, до њиховог агрегирања, повећања честица и промене физичких и реолошких својстава. Због тога је од изузетне важности испитати корелацију између интензитета и параметара ултразвучног претретмана (време третирања, амплитуда, фреквенца), ензимске хидролизе и биолошких својстава добијених фракција пептида. Наведени захтеви не представљају једноставан задатак и захтевају испитивање великог броја параметара и протеолитичких ензима са ендо- и егзо-пептидазним механизмом деловања.

У оквиру карактеризације добијених хидролизата ултразвучно претретираних протеина беланцета, као полазних производа за изоловање фракција пептида, али и карактеризацију изолованих фракција пептида коришћене су различите методе за одређивање антиоксидативне активности и то: способност инхибиције DPPH<sup>•</sup> радикала, ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона, супероксид и хидроксил радикала, способност хелирања металних јона и способност инхибиције липидне пероксидације. Све ове методе поседују одређене специфичности, односно другим речима, биолошки активни пептиди ће реаговати различитим интензитетом и по другачијем механизму, па самим тим исти пептиди неће испољити идентичан степен антиоксидативне активности када се тестирају различитим методама. Ово је важно јер приликом испитивања антиоксидативних својстава треба користити што више метода за одређивање антиоксидативне активности како би се добила комплетна слика реалне способности одређених биоактивних пептида да делују као антиоксиданси и спречавају нежељене реакције слободних радикала у организму. Вишак слободних радикала може проузроковати одвијање различитих оксидативних реакција, које пак могу довести до оштећења ћелија и/или њихових делова. Као такав, оксидативни стрес и слободни радикали сматрају се иницијаторима и/или пропагаторима болести попут кардиоваскуларних болести, упалних процеса, канцера и дијабетеса. Зато је од посебног значаја успоравање оксидативних процеса у ћелијама услед узимања различитих дијететских суплемената или у храни услед додатака различитих природних и синтетских антиоксиданаса. Познато је да протеини и биоактивни пептиди изведени из протеина имају велике предности у односу на синтетичка средства, као што су синтетички антиоксиданси и синтетичка лековита средства. Међутим, и поред великог интереса за овим природним биолошки активним суплементима и додацима уз исхрану, на тржишту у нашој земљи још увек нема суплемената на бази природних протеина са верификованом антиоксидативном и антитуморском активношћу. Из наведеног, јасно је да је одређена антипролиферативна активност према туморским ћелијским линијама аденокарцинома дојке и колоректалног аденокарцинома како хидролизата ултразвучно претретираних протеина беланцета тако и изолованих фракција пептида од посебног значаја. Шта више, и остале одређене биолошке активности, као што су антимикуробна активност, антихипертензивна и антикоагулативна доприносе проширењу могућности примене произведених биоактивних пептида из протеина беланцета.

Најважније, у овој докторској дисертацији утврђено је постојање синергистичког ефеката две или више биолошких активности пептида беланцета што у досадашњим истраживањима није довољно испитано, као и реалације између појединачних пептида и једне од биолошких активности, чиме су у потпуности испуњени захтеви за савременост и оригиналност спроведеног научног истраживања.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Током израде докторске дисертације кандидат је извршио детаљан преглед научне и стручне литературе из релевантних научних области везаних за проблематику докторске дисертације.

Цитирана су 387 литературна навода која су омогућила да се јасно представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Већину

прегледане литературе чине радови публиковани у врхунским међународним часописима од стране еминентних стручњака у испитивној научној области. На основу овог пресека стања у литератури изложене су основне смернице за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из пописа литературе која је коришћена у истраживању, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

### 3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

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

Ензимска реакција хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета изведена је у поченој фази истраживања у шаржном реактору са аутоматском контролом температуре  $\pm 0,5$  °C и вредности рН  $\pm 0,1$  уз контролисано мешање механичком месалицом са четири пропелера и остале хидродинамичке услове. Ток и кинетика ензимске хидролизе протеина беланцета одређен је праћењем вредности основног параметра, степена хидролизе, рН-стат методом. Степен хидролизе у овом случају директно је пропорционалан количини  $\alpha$ -амино група које се ослободе у току реакције и количини утрошене базе за одржавање константне рН вредности. Количина ослобођених  $\alpha$ -амино група је верификована и применом две спектрофотометријске методе: метода са 2,4,6-тринитробензенсулфонском киселином (TNBS) и метода са нинхидринским реагенсом. Уклањање соли из хидролизата након завршене хидролизе обављено је процесом дијализе помоћу црева за дијализу тачно дефинисаних величина пора. Расподела молекулске масе произведених хидролизата протеина беланцета одређена је извођењем SDS-PAGE електрофорезе у јединици за вертикалну електрофорезу (Hoefer Ruby vertical system; GE Healthcare Life Sciences, SAD). На основу добијене расподеле молекулских маса ултрафилтрационо раздвајање хидролизата протеина беланцета извешено је коришћењем ултрафилтрационе једнице (Millipore Corporation, Bedford, MA, SAD) и одговарајућих мембрана израђених од регенерисане целулозе различитих величина пора 30, 10, 3 и 1 kDa. Након утврђивања биолошки најактивније фракције пептида спроведено је дизајнирање проточног мембранског реакторског система са рецикулацијом и мембранским модулом одговарајуће величине пора (*cut off*), који је омогућио истовремено одвијање ензимске реакције и сепарацију биолошки активне фракције. Напредовање и ток реакције у мембранском реакторском систему такође је праћено на основу степена хидролизе који је директно пропорционалан количини  $\alpha$ -амино група које се ослободе у току реакције и количини утрошене базе за одржавање константне рН вредности.

Изоловање и пречишћавање фракција пептида протеина беланцета, окарактерисаних као биолошки најактивнијих, са аспекта антиоксидативне активности извршено је препаративном гел-филтрационом хроматографијом применом колоне за чије пуњење се користила комерцијално доступна суспензија Toyopearl HW-40F (метакрилни полимер са уведеним хидроксилним групама који служи за раздвајање биомолекула у опсегу молекулских маса 10-0,1 kDa). Исто тако примењена је течно масена (LC-MS) и реверзно-фазна хроматографија високох перформанси (RC-HPLC) применом семи-препаративне и аналитичке C-18 колоне.

Промене у структури нативног протеина беланцета након ултразвучних претретмана дејством ултразвучне сонде и у ултразвучном купатилу, и/или добијених протеинских хидролизата окарактерисане су мерењем средње величине честица, њихове расподеле и полидесперзног индекса применом технике динамичког расипања светлости помоћу уређаја Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Исти уређај коришћен је за одређивање зета-

потенцијала ултразвучно претретираних протеина беланцета дајући информацију о мери стабилности честица унутар датог система. Површинска хидрофобност ултразвучно претретираних протеина беланцета одређена је спектрофлуорометријски помоћу спектрофлуориметра (Horiba FluoroMax®4) према модификованој методи из литературе.

Антиоксидативна активност хидролизата и/или фракција пептида свеобухватно је испитана спектрофотометријским мерењем способности хидролизата и/или фракција пептида да:

- редукују 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал (DPPH<sup>•</sup>) и 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) радикалски катјон (ABTS<sup>•+</sup>),
- инхибирају оксидацију  $\alpha$ -дезоксирибозе (тзв. метода неутрализације хидроксилног радикала, <sup>•</sup>ОН) и инхибирају оксидацију пирогалола (тзв. метода неутрализације супероксид радикала, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>),
- хелирају металне јоне (јоне гвожђа) и
- инхибирају липидну пероксидацију на моделу пероксидације линолне киселине и емулзије  $\beta$ -каротен-линолна киселина.

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

Антимикробна активност хидролизата и/или фракција пептида испитана је стандардним *in vitro* тестом - методом дифузије на агарној подлози и бујон дилуционом методом. Квалитативно и квантитативно, антимикробна активност је изражена дефинисањем ширине зоне инхибиције и минималне инхибиторне концентрације. Микробиолошки тестови спроведени су на Грам-позитивним (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), Грам-негативним (*Escherichia coli* ATCC 25922) стандардизованим културама бактерија и квасаца (*Candida albicans* ATCC 24433). Антипролиферативна активност испитиваних хидролизата и/или фракција пептида тестирана је на две туморске ћелијске линије: MCF-7 (хумана ћелијска култура аденокарцинома дојке) и SW480 (хумана ћелијска линија колоректалног аденокарцинома). Испитивања инхибиторног дејства на пролиферацију туморских ћелија MCF-7 и SW480 хидролизата и/или фракција пептида верификовано је валидним колориметријским МТТ тестом, при чему је мерење оптичке густине изведено на аутоматском читачу микротитарских плоча на таласној дужини 540 nm (Labsystems Multiskan Plus, Финска). Додатно, испитивање цитотоксичног ефекта хидролизата и/или фракција пептида обухватило је тестирање утицаја хидролизата и/или фракција пептида на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перидонталног лигамента, као типа примарних хуманих ћелија.

Антихипертензивна активност хидролизата и/или фракција пептида и пречишћених пептида одређено је *in vitro* спектрофотометријском методом на основу мерења АСЕ-инхибиторне активности коришћењем читача микротитарских плоча (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, UK). Као супстрат коришћен је се хипурил-хистидил-леуцин и ангиотензин-конвертујући ензим из плућног ткива зеца. Инхибиторна активност је изражена као концентрација потребна да се инхибира 50% АСЕ-активности (IC<sub>50</sub>). Каптоприл, активни инхибитор ензима који конвертује неактивни ангиотензин I у активни облик, ангиотензин II, користишћен је као стандард. Антикоагулациона активност хидролизата и/или изолованих фракција пептида обухватила је мерење времена коагулације рекалцификоване плазме коришћењем читача микротитарских плоча (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, UK). Јединица антикоагулационе активности том приликом дефинисана је као она количина протеина потребна да удвостучи време коагулације контроле, плазме.

Сва наведена испитивања изведена су према оригиналним или модификованим методама из литературе.

### 3.4. Применљивост остварених резултата

Прегледом објављених експерименталних података и резултата приказаних у оквиру ове докторске дисертације остварен је значајан допринос у могућности имплементације ултразвука високог интензитета као претретмана субсеквентној парцијалној ензимској хидролизи за производњу хидролизата и/или фракција пептида са унапређеним биолошким активностима. Резултати добијени у току рада на овој докторској дисертацији дају значајан научни допринос објашњењу могућег механизма деловања ултразвучних таласа на структуру комплексне смеше нативних протеина беланцета, пре свега са аспекта површинских карактеристика молекула протеина беланцета попут хидрофобности површине и зета потенцијала, али и расподеле величине честица и садржаја сулфхидрилних група. Добијени резултати дају значајан научни допринос пре свега изоловању и карактеризацији биоактивних пептида из нативног беланцета, али се не треба занемарити и допринос на пољу унапређења производње хидролизата (смеше ди-, три- и олигопептида) ензимском хидролизом ултразвучно претретираних нативних протеина беланцета. На основу дефинисаног утицаја ултразвучних таласа одређене фреквенце ( $20 \pm 0,2$  и/или  $40 \pm 2$  kHz), снаге и интензитета под контролисаним условима успостављене су важне корелације на основу којих се може теоретски предвидети утицај ултразвука на доступност нативних протеина беланцета протеолитичким ензимима и антиоксидативну активност хидролизата протеина, а најважније на масени удео и биолошку активност изолованих ултрафилтрационих фракција пептида. Тиме добијени резултати указују на значајне корелације између механизма деловања ултразвучних таласа (ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz и/или ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz), механизма деловања протеолитичких ензима и биолошке активност добијених хидролизата и/или биоактивних пептида.

Увидом у доступну литературу, велики број истраживања заснива се на ензимској хидролизи модел протеина беланцета, најчешће овалбумина, овотрансферина и лизозима, и изоловању и карактеризацији биоактивних пептида управо из ових протеинских фракција и/или њихових хидролизата. Међутим, нема много радова у којима се као полазни супстрат користи нативно беланце, тј. смеша свих градивних протеина беланцета, претретирано ултразвучним таласима и накнадно подвргнуто дејству протеолитичких ензима. Управо је ово један од најзначајних научних доприноса ове докторске дисертације, јер је синергистички ефекат ултразвучног претретмана и субсеквентне ензимске хидролизе детаљно објашњен на реалном индустријском супстрату. Резултати добијени у току рада на овој докторској дисертацији дају значајан научни допринос и објашњењу механизма антиоксидативног деловања појединих фракција пептида, као и увиде у корелацију између интензитета хидролизе (степен хидролизе) и антиоксидативне активности.

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

Резултати остварени у оквиру плана истраживања ове дисертације имају изузетан практичан значај и могу послужити као основа за формулисање биолошки активних пептида беланцета садржаних у финалној формулацији производа који уједно представљају део



нових технолошких поступака производње неких прехранбених производа обogaћених фракцијама биоактивних пептида. Такође, дефинисани су параметри при третирању протеина беланцета ултразвуком високог интензитета и развијен је ефикасан континуални мембрански ензимски процес за производњу фракција пептида дефинисаног састава и са антиоксидативном и антипролиферативном активностима у великом приносу.

### 3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Јелена Р. Јовановић, мастер инжењер технологије, је током израде докторске дисертације испољила изузетну стручност и самосталност у претраживању и коришћењу научне литературе, планирању и реализацији експеримената, као и коришћењу различитих техника и метода. При анализи, обради и дискусији резултата је показала самосталност, систематичност и креативности. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

## **4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС**

### 4.1. Приказ остварених научних доприноса

Главни научни допринос ове докторске дисертације представља развој иновативног технолошког поступка који се заснива на кобинованој примени ултразвука високог интензитета 20-45 kHz и субсеквентне контролисане и парцијалне ензимске хидролизе за добијање хидролизата унапређених биолошких својстава, који се потом користе за изоловање биоактивних фракција пептида. Наведен научни допринос подразумевао је неколико појединачних доприноса:

- Нова сазнања о могућности примене ултразвука високог интензитета као претретамана протеина беланцета насупрот конвенционалног третмана високом температуром;
- Утицај технологије ултразвука високог интензитета на структуру протеина беланцета и доступност пептидних веза протеолитичким ензимима. Утврђивање корелације степена денатурације протеина ултразвуком и степена хидролизе;
- Оптимизација биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета у шаржном реакторском систему са аспекта дефинисања процесних параметара и утицаја врсте и специфичности ендо- и егзо-пептидаза у једноступеном и двоступеном ензимског поступку хидролизе протеина беланцета;
- Испитивање кинетике ензимске реакције у шаржном реакторском систему и утврђивање кинетичког модела и кинетичких параметара за описивање ензимске хидролизе протеина беланцета и предвиђање тока реакције у дужем временском периоду;
- Дефинисање утицаја ултразвука као претретмана ензимске хидролизе на кинетику ензимске реакције, као и на ослобађање антиоксидативних пептида током ензимске хидролизе, што добијене хидролизате издваја као нутритивне и биолошки активне суплементе;
- Утврђивање ефикасног начина сепарације биолошки активне фракције пептида и то ултрафилтрационо фракционисање хидролизата нативних протеина беланцета кроз целулозне мембране различитих величина пора (*cut-off* 30, 10, 3 и 1 kDa);
- Карактеризација изолованих фракција пептида са аспекта неколико биолошких активности:

- антиоксидативне која је верификована мерењем способности неутрализације DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> хидроксили и супероксид радикала, хелирања јона гвожђа и инхибиције липидне пероксидације,
- антипролиферативне која је верификована мерењем способности инхибиције пролиферације туморских ћелијских линија аденокарцинома дојке и колоректалног аденокарцинома,
- антимицробне која је верификована мерењем зоне инхибиције раста Грам-позитивних и Грам-негативних бактеријских сојева током агар дифузионог теста,
- антихипертензивне која је одређена мерењем способности инхибиције активности ангиотензин-конвертујућег ензима и
- антикоагулативне мерењем времена коагулације рекалцификоване плазме;
- Дефинисање утицаја ултразвучног претретмана у поређењу са термичким на удео и биолошку активност фракција пептида;
- Оптимизација биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета у мембранском реакторском систему са рецикулацијом и карактеризација биоактивних пептида у мембранским фракцијама са аспекта антиоксидативне активности;
- Утврђивање корелације између структуре и дужине секвенце пептида и једне од биолошких активности, као и успостављање корелације међу различитим биолошким активностима изолованих фракција пептида, на основу чега су добијени увиди у механизам деловања ових пептида;
- Изоловање две и/или три биолошки активне фракције пептида применом мембранских сепарационих техника и препаративне гел-пермеационе хроматографије, које су окарактерисане и чија је антиоксидативна активност верификована мерењем способности инхибиције ABTS<sup>\*\*</sup> радикалског катјона.

#### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне литературе из ове области истраживања која разматра ензимске процесе за добијање хидролизата и/или пептида протеина беланцета као компонената функционалне хране, као и разматрањем резултата добијених у овој докторској дисертацији, уочава се да резултати из ове докторске дисертације значајно допуњују постојећа сазнања из поменуте области. Наиме, оптимизацијом кључних реакционих фактора и успешном имплементацијом ултразвучног претретмана, значајно су унапређена биолошки активна својства, пре свега антиоксидативна активност, протеина беланцета, а уједно и повећана ефикасност ензимске хидролизе. Развојем ефикасног ензимског поступка у шаржном реакторском систему, као и успостављањем одговарајућег кинетичког модела постављени су основи за увећање размера и аутоматизацију процеса добијања хидролизата протеина беланцета са тачно дефинисаним биолошки активним својствима, као и појединачних фракција пептида са дефинисаном антипролиферативном, антиоксидативном, антимицробном и антихипертензивном активношћу. Том приликом, велика пажња посвећена је успостављању корелације међу дефинисаним активностима узимајући у обзир дужину и величину изолованих пептида. Посебан значај има одабир одговарајуће фракције пептида као најактивније у циљу развоја ефикасног проточног реактора са мембранском сепарационом јединицом и добијања пептида протеина беланцета жељених биоактивности.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Јелена Р. Јовановић је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштењима на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су до сада у оквиру два рада у научним часописима

међународног значаја (категоризације M22-један рад и M23-један рад), десет саопштења на међународним и националним скуповима од којих су пет штампана у целини и једног патента објављеног на националном нивоу. Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још десет радова у часописима међународног значаја, три рада у часописима националног значаја, поглављу у монографији водећег међународног значаја и петнаест саопштења на скуповима међународног и националног значаја.

### **Научни радови који су део дисертације**

#### Категорија M22:

1. **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Tanasković, S. M. J., Dojčinović, M. B., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Ultrasound Pretreatment as an useful tool to enhance egg white protein hydrolysis: Kinetics, reaction model, and thermodynamics. *J Food Sci.* 81(11):C2664–C2675, ISSN: 0022-1147, IF (2016) = 1,815, *Food Science and Technology* (52/130).

#### Категорија M23:

1. **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Milena, Ž. G., Jakovetić, S. M., Šekuljica, N. Ž., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration, *Hem Ind.* 70(4):419-428, ISSN: 0367-598X, IF (2016) = 0,459; *Engineering, Chemical* (125/135).

#### Категорија M33:

1. Knezevic-Jugovic, Z., Stefanovic, A., **Jovanovic, J.**, Zuza, M., Grbavcic, S., Jakovetic, S., Dojcinovic, M., Lukovic, N., Ultrasound-induced changes in functional properties of egg white proteins and in their susceptibility to enzymatic hydrolysis, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 41st International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia*, 126-135, 26-30 May 2014, ISBN: 978-80-89475-13-1

2. Knežević-Jugović, Z. D., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Žuža, M. G., Šekuljica, N. Ž., Manojlović, V. B., Bugarski, B. M., Antioxidant activity of peptide fractions obtained by membrane ultrafiltration of egg white protein enzymatic hydrolysates, Editor: Gligorić, M., In *Proceedings of the IV Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 278-287, 04-06 March 2015, CD Proceedings, ISBN: 978-99955-81-18-3

3. **Jovanović J.**, Stefanović, A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Elmalimadi, M., Bugarski, B., Knežević- Jugović, Z., Peptides with improved antimicrobial activity screened by membrane ultrafiltration from egg white protein hydrolysates, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia*, 732-739, 25-29 May 2015, ISBN 978-80-89475-14-8

#### Категорија M34:

1. Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Gluvić, A., Jakovetić, S. Luković, N., Žuža, M., Knežević-Jugović, Z., Kinetic model of the hydrolysis of egg white proteins by Alcalase, 8 th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd, 27-29. jun 2013., str 235., CD Proceedings, ISBN 987-86-7132-053-5

2. Luković, N., Jakovetić, S., Grbavčić, S., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Šekuljica, N., Knežević-Jugović, Z., Production of antioxidative egg-white hydrolysates ina cyrcle batch membrane reactor, In: Vladimir Kakurinov, Prof. Dr (editor): 7 th Central European Congress on Food-CEFood, Food

Chain Intergadion, Ohrid, Macedonia, 21-24 May 2014, Book of Abstract, page 220, ISBN 987-608-4565-05-5

3. **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Jakovetić, S., Luković, L., Šekuljica, N., Žuža, M., Knežević-Jugović, Z., Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis, In: Vladimir Kakurinov (editor): 1st Conference on Food Quality and Safety, Health and Nutrition-Nuticon 2014, Book of Abstracts, 27-28 November 2014, Skopje, Macedonia, page 76, ISBN 987-608-4565-06-2

4. Knežević-Jugović, Z., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Jakovetić, S., Grbavčić, S., Elmalimadi, M., Bugarski, B., Hydrolysis of egg white and wheat proteins with protease from bacillus licheniformis: fractionation and identification of bioactive peptides, Editor: Markoš, J., In Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia, 753-753, 25-29 May 2015, ISBN 978-80-89475-14-8

5. **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Grbavčić, S. Ž., Jakovetić Tanasković, S. M., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., Antibacterial and antioxidant capacity of egg white hydrolysates screened from proteolysis-assisted high intensity ultrasound treatment, 2nd International Conference on Ultrasound-based Applications: from analysis to synthesis - ULTRASONICS 2016, Caparica-Almada, Portugal, 6th-8th June 2016, Book of Abstracts, page 62, ISBN: 978-989-99361-9-5

#### Kategorija M63:

1. **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Žuža, M., Šekuljica, N., Jakovetić, S., Luković, N., Knežević-Jugović, Z., Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije, u: Vladimir Dasković i Dušan Marković (ur.): XIX Savetovanje o biotehnologiji, Čačak 07-08. Mart 2014., Zbornik radova, Vol. 19 (21), str. 281-285, ISBN: 987-86-87611-31-3

2. Žuža, M., Gluvić, A., Jakovetić, S., Luković, N., Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Knežević-Jugović, Z., Antioksidativna aktivnost hidrolizata belanceta i njegovih frakcija dobijenih membranskom ultrafiltracijom, u: Vladimir Dasković i Dušan Marković (ur.): XIX Savetovanje o biotehnologiji, Čačak 07-08. Mart 2014., Zbornik radova, Vol. 19 (21), str. 275-279, ISBN: 987-86-87611-31-3

#### Kategorija M94:

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

### Остали научни радови кандидата

#### Kategorija M13:

1. Knežević Jugović, Z. D., Grbavčić S. Ž., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Bezbradica, D. I., Mijjin, D. Ž., Antov M., (2017) Covalent immobilization of enzymes on Eupergit® supports: Effect of the immobilization protocol. In: Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Ed. Shelley D. Minter, Springer, vol 1504, pp. 75-91, New York, ISSN: 1064-3745, ISBN: 978-1-4939-6497-0.

#### Kategorija M21a:

1. Elmalimadi M. B., **Jovanović J. R.**, Stefanović, A. B., Jakovetić Tanasković, S. M., Djurović, S. M., 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*, 109C:548-557, ISSN: 0926-6690, IF (2015) = 3,449, *Agricultural Engineering* (2/14).

2. Jakovetić, S., Luković, N., Jugović, B., Gvozdenović, M., Grbavčić, S., **Jovanović, J.**, Knežević-Jugović, Z., (2015) Production of antioxidant egg white hydrolysates in a continuous stirred tank enzyme reactor coupled with membrane separation unit, *Food Bioprocess Tech.* 8(2):287-300, ISSN: 1935-5130, IF (2013) = 3,126, *Food Science and Technology* (12/122).

#### Kategorija M21:

1. Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Dojčinović, M., Lević, S. Nedović, V., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z., (2017) Effect of the controlled high intensity ultrasound on improving functionality and structural changes of egg white proteins, *Food Bioprocess Tech.* 10(7):1224-1239, ISSN: 1935-5130, IF (2016) = 2,576, *Food Science and Technology* (26/130).

2. Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Balanč, B. D., Šekuljica, N. Ž., Tanasković, S. M. J., Dojčinović, M. B., Knežević-Jugović, Z. D., (2018) Influence of Ultrasound Probe Treatment Time and Protease Type on Functional and Physicochemical Characteristics of Egg White Protein Hydrolysates, *Poult Sci.* pey055, doi: 10.3382/ps/pey055, ISSN: 0032-5791, IF (2016) = 1,908, *Agriculture, Dairy & Animal Science* (6/58).

#### Kategorija M22:

1. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Djokić, V. R., Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin, *Bioprocess Biosyst Eng.* 39(3):461-472, ISSN: 1615-7591, IF (2014) = 1,997, *Biotechnology and Applied Microbiology* (86/163)

2. Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Grbavčić, S. Ž., Šekuljica, N. Ž., Manojlović, V. B., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., (2014) Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production, *Eur Food Res Technol.* 239(6):979-993, ISSN: 1438-2377, IF (2014) = 1,559; *Food Science and Technology* (53/122).

3. Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., Grbavčić, S., Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z., (2018) Production of egg white protein hydrolysates with improved antioxidant capacity in a continuous enzymatic membrane reactor: optimization of operating parameters by statistical design, *J Food Sci Technol.* 55(1):128-137, ISSN: 0022-1155, IF (2016) = 1,262; *Food Science & Technology* (74/130).

4. Žuža, M. Ž., Milašinović, N. Z., Jonović, M. M., **Jovanović, J. R.**, Kalagasidis Krušić, M. T., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., (2017) Design and characterization of alcalase-chitosan conjugates as potential biocatalysts, *Bioprocess Biosyst Eng.* 40(11):1713-1723, ISSN: 1615-7591, IF (2015) = 1,901; *Biotechnology & Applied Microbiology*, (94/161).

#### Kategorija M23:

1. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Grbavčić S. Ž., Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., (2016) Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye, *Hem Ind.* 70(2):217-224, ISSN: 0367-598X, IF (2016) = 0,459; *Engineering, Chemical* (125/135).

2. Elmalimadi, M. B., Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Žuža, M. Ž., 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, *J Food Process Pres.* 41(5):e13207, ISSN: 0145-8892, IF (2015) = 0,894; *Food Science & Technology* (81/125).

#### Kategorija M51:

1. Djukic-Vukovic, A., Mladenovic, A., **Jovanovic, J.**, Knezevic-Jugovic, Z., Kocic-Tanackov, S., Pejin, J., Mojovic, Lj., (2016) Ultrasound as a physical treatment of stillage for lactic acid fermentation, *J Process Energ Agr.* 20(1):13-16, ISSN: 1821-4487 (udc: 547.472.3:66.084.8).

2. Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Dojčinović, M., Lević, C., Žuža, M., Nedović, V., Knežević-Jugović, Z., (2014) Impact of high-intensity ultrasound probe on the functionality of egg white proteins, JHED, 6:215-224, ISSN: 1857-8489 (udc: 637.413.054).

#### Kategorija M52:

1. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Jakovetić, S. M., Knežević-Jugović, Z. D., Mijin, D. Ž., (2016) The oxidation of anthraquinone dye using HRP immobilized as a cross-linked enzyme aggregates, Adv Technol. 5(2):18-26, ISSN: 2406-3037 (udc: 577.152.3:66.098:667.283.6).

#### Kategorija M33:

1. Knezevic-Jugovic, Z., Stefanovic, A., **Jovanovic, J.**, Zuzza, M., Grbavcic, S., Jakovetic, S., Dojcinovic, M., Lukovic, N., Ultrasound-induced changes in functional properties of egg white proteins and in their susceptibility to enzymatic hydrolysis, Editor: Markoš, J., In Proceedings of the 41st International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia, 126-135, 26-30 May 2014, ISBN: 978-80-89475-13-1

2. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., **Jovanović, J. R.**, Stefanović, A. B., Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., Kaolin as a support for the immobilization of horseradish peroxidase: application in anthraquinonic dyes decolorization from wastewater, Editor: Gligorić, M., In Proceedings of the IV Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 287-292, 04-06 March 2015, CD Proceedings, ISBN: 978-99955-81-18-3

3. Elmalimadi M., Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Šekuljica, N., Tanasković, S., Antov, M., Knežević-Jugović, Z., Functional improvements in wheat gluten through alcalase-assisted hydrolysis and thermal pretreatment, Editor: Markoš, J., In Proceedings of the 43th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia, 874-882, 23-27 May 2016, ISBN 978-80-89597-35-2

4. 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, Environment and Materials in the Processing Industry", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 145-153, March 15-17th 2017, CD Proceedings, ISBN 978-99955-81-22-0

5. Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Stojaković, S., Jugović, B., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z., Enhancing protein release and functionality of soy proteins from defatted soy flakes using high-intensity ultrasound-assisted extraction, Editor: Miladin Gligorić, In Proceedings of V International Congress "Engineering, Environment and Materials in the Processing Industry", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 324-334, March 15-17th 2017, CD Proceedings, ISBN 978-99955-81-22-0

6. Knezevic-Jugovic, Z., Sekuljica, N., **Jovanovic, J.**, Stefanovic, A., Stojakovic, S.: Improved extraction of soybean protein from defatted soybean flakes in terms of yield and protein functional properties, Editors: Blahušiak, M., Mihal, M., In 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, Demänovská dolina, Slovakia, 767–774, 2017, CD Proceedings, ISBN 978-80-89597-58-1

#### Kategorija M34:

1. Knežević-Jugović, Z., Žuža, M., Gluvić, A., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Manojlović, V., Bugarski, B., Biochemical and functional properties of egg white hydrolysates produced by different proteases, 8 th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd, 27-29. jun 2013., str 232. CD Proceedings, ISBN 987-86-7132-053-5

2. Jakovetić, S., Luković, N., Grbavčić, S., **Jovanović, J.**, Stefanović, A., Carević, M., Knežević-Jugović, Z., The kinetic study of oleyl cinnamate synthesis, 8 th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd, 27-29. jun 2013., str 246., CD Proceedings, ISBN 987-86-7132-053-5

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
4. Djukić-Vuković, A., Mladenović, D., Stefanović, A., **Jovanović, J.**, Knežević-Jugović, Z., Pejin, J., Mojović, Lj., Ultrasound-assisted pretreatment of distillery stillage for lactic acid production, 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Field in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies (incorporating The 3rd International Bio & Food Electrotechnologies Symposium and Bioelectrics 2015 - The 12th International Bioelectrics Symposium), Portorož, Slovenia, September 6 to 10, 2015, Wed-C1-P7, Programme and book of abstracts, page 112, ISBN 978-961-243-284-3
5. **Jovanović, A.**, Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Trifković, K., Jovanović, J., Nedović, V., Bugarski, B., Ultrasound Extraction of Polyphenolic Compounds from Thymus serpyllum, 29th EFFoST International Conference, Food Science and Innovation: Delivering sustainable solutions to the global economy and society, 10-12 november 2015, Athens, Greece, Book of Abstract, page 1386, ISBN 978-618-82196-1-8 (Izdavač Elsevier B. V.)
6. Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Šekuljica, N. Ž., Grbavčić, S. Ž., Luković, N. D., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D., Structural and functional characterization of papain-assisted ultrasound pretreated egg white hydrolysis, 2nd International Conference on Ultrasound-based Applications: from analysis to synthesis - ULTRASONICS 2016, Caparica-Almada, Portugal, 6th-8th June 2016, Book of Abstracts, page 43, ISBN: 978-989-99361-9-5

#### Kategorija M63:

1. Grbavčić, S., Said, O. A., **Jovanović, J.**, Luković, N., Žuža, M., Bezbradica, D., Knežević-Jugović, Z., Proizvodnja lipaza i proteaza iz Candida utilis tehnikom gajenja na čvrstoj podlozi, Biotehnologija za održivi razvoj, Beograd, 24-26. Novembar 2010. str 49-52., CD sa objavljenim radovima, ISBN: 978-86-7401-269-7

#### Kategorija M64:

1. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., Obezbojavanje antrahinonskih boja peroksidazom izolovanom iz svežeg ekstrakta rena, 52. Savetovanje Srskog hemijskog društva, Novi Sad, 29. i 30. maj 2015., Kratki izvodi radova, str. 100, ISBN 978-86-7132-056-6.
2. Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Stefanović, A. B., **Jovanović, J. R.**, Mijin, D. Ž., Knežević-Jugović, Z. D., Dekolorizacija antrahidronskih boja iz otpadnih voda imobilisanom peroksidazom iz rena, XI simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj“, Zbornik izvoda radova, str. 67, 22-24. oktobar 2015, Tehnološki fakultet, Leskovac, ISBN 987-86-89429-12-1

#### Kategorija M87:

1. Zorica Knežević-Jugović, Andrea Stefanović, **Jelena Jovanović**, Nataša Šekuljica, Dušan Mijin, Verica Đorđević, Nikola Milašinović, „Izolovanje sojinih proteina kombinovanom primenom mikrotalasnog pretretmana i enzimske ekstrakcije“, patentna prijava P-2017/0539, Zavod za intelektualnu svojinu, Beograd, Republika Srbija, u postupku priznavanja.

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације **Јелене Р. Јовановић**, мастер инж. технологије под називом „**Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација**“ сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на конференцијама од међународног и националног значаја. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „**Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација**“ кандидата **Јелене Р. Јовановић** прихвати, изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....  
**Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор,**

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
**Проф. др Бранко Бугарски, редовни професор,**

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
**Проф. др Радивоје Продановић, редовни професор,**

Универзитет у Београду, Хемијски факултет

.....  
**Проф. др Маја Вукашиновић-Секулић, ванредни професор,**

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
**Др Соња Јаковетић-Танасковић, научни сарадник,**

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет