

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Andree Stefanović, master inž. tehnologije.

Odlukom 35/95 br. od 20.4.2017. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Andree Stefanović pod naslovom

Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta

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

R E F E R A T

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

Školske 2011/12 godine (14.10.2011.) kandidat Andrea Stefanović, master inž. tehnologije upisala je Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu, Tehnološko- metalurški fakultet, profil Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija.

3.3.2016. - Kandidat Andrea Stefanović, master inž. tehnologije predložila je temu doktorske disertacije pod nazivom: „Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta“, a Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu usvojilo Komisiju za ocenu naučne zasnovanosti predložene teme (br. odluke 35/97 od 3.3.2016.).

26.5.2016. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, na osnovu podnetog referata komisije, doneta je odluka (br. 35/252) o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Andree Stefanović, master inž. tehnologije, pod nazivom „Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta“, a za mentora ove doktorske disertacije imenovana je dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta.

13.6.2016. - Na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Andree Stefanović, master inž. tehnologije, pod nazivom „Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta“.

20.4.2017. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka o imenovanju komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Andree Stefanović, master inž. tehnologije, pod nazivom „Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta“ (br. odluke 35/95).

1.2. Naučna oblast disertacije

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

1.3. Biografski podaci o kandidatu

Andrea B. Stefanović, master inženjer tehnologije, rođena je 5. januara 1987. godine u Gradačcu. Osnovnu školu, gimnaziju i srednju muzičku školu završila je u Bijeljini. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu (na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija) Univerziteta u Beogradu upisala je 2006. godine. Diplomirala je na istom fakultetu 22.9.2010. odbranom diplomskog rada pod nazivom "Proizvodnja mleka bez laktoze pomoću beta-galaktozidaze" sa ocenom 10 (deset) čime je stekla zvanje diplomirani inženjer tehnologije. Master akademske studije, na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je 2010. godine. 26.9.2011. Završila je master akademske studije na istom fakultetu odbranom master rada pod nazivom „Kovalentna imobilizacija penicilin acilaze iz *Escherichia coli* na makroporoznom kopolimeru glicidimetakrilata i etilenglikoldimetakrilata“ sa ocenom 10 (deset) i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,25, čime je stekla zvanje master inženjer tehnologije. Diplomski rad, kao i master rad, radila je na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta. Doktorske studije, na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je 2011. godine. Položila je sve ispite predviđene nastavnim planom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,82. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je 10.7.2012. godine, a u zvanje istraživač saradnik 9.4.2015. godine. Od 1.1.2012. godine zaposlena je kao istraživač-saradnik na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III46010, pod nazivom „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“. Od oktobra 2016. godine angažovana je na projektu „Razvoj novih enzimskih tehnologija za modifikaciju sojinih proteina i unapređenje njihovih funkcionalnih svojstava“ (EUREKA projekat, E19936 - SOYZYME) pod rukovodstvom Z. Knežević-Jugović. Od septembra 2015. godine angažovana je u nastavi na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija na laboratorijskim vežbama iz predmeta: Biotehnološki praktikum 2 i Enzimsko inženjerstvo na profilu farmaceutsko inženjerstvo.

Koautor je 11 (jedanaest) radova u međunarodnim časopisima (kategorizacije M21a (jedan rad), M21 (tri rada), M22 (tri rada), M23 (tri rada) i M24 (jedan rad), kao i tri rada u nacionalnim časopisima (dva rada kategorizacije M51 i jedan rad M52). Saopštila je u saradnji sa koautorima 31 saopštenje na domaćim i međunarodnim skupovima (10 saopštenja kategorizacije M33, 10 M34, 7 M64, 3 M63, i 1 M64).

U čitavom ovom periodu neposredno je učestvovala u izradi, organizovanju i izvođenju 26 diplomskih i master radova studenata studijskog programa Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Andree Stefanović napisana je na 250 strana, sa ukupno 9 poglavlja, 69 slika, 29 tabela i 457 literaturnih navoda. Doktorska disertacija sastoji se iz sledećih poglavlja: Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura, uz izvode na srpskom i engleskom jeziku.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U poglavlju **Uvod** prikazan je kratak osvrt na oblast istraživanja, definisan je predmet istraživanja i aktuelnost problematike u svetu, kao i glavni ciljevi disertacije. Data su osnovna razmatranja o značaju proteina belanceta i njihovih hidrolizata posmatrana kroz njihova tehnološko-funkcionalna svojstva i potencijalnu upotrebu, sa osvrtom na potrebu primene odgovarajućeg pretretmana u cilju poboljšavanja ovih svojstava. Akcenat je stavljen na prednosti primene ultrazvučnog pretretmana u odnosu na tradicionalni termički pretretman procesiranja proteina hrane. Posebna pažnja posvećena je prednostima primene ultrazvučnog pretretmana neposredno pre enzimske hidrolize proteina belanceta, u odnosu na enzimsku hidrolizu bez pretretmana. Na kraju poglavlja predstavljani su ciljevi rada i plan istraživanja.

U **Teorijskom delu** opisana su fizičko-hemijska svojstva proteina belanceta od značaja za njihovu primenu u prehrambenoj industriji. Potom su detaljno opisana struktura i svojstva pojedinačnih frakcija proteina belanceta i istaknut je njihov značaj. U nastavku je poseban osvrt napravljen na mehanizam dejstva ultrazvučnih talasa, kao i na potencijalnu komercijalnu primenu ultrazvuka u prehrambenoj industriji. Tehnologija primene ultrazvuka visokog intenziteta (frekvenci od 16 do 100 kHz) može biti vrlo korisna kod minimalnog procesiranja proteinskih sirovina, jer se ograničava povišenje temperature tokom tretmana, i time omogućava očuvanje senzornih i nutritivnih svojstava proteina. Prenos akustične energije kroz supstrat je brz i celovit, što omogućava redukciju ukupnog vremena obrade i manju potrošnju energije. Kada se putem tretiranja sirovine ultrazvukom unese tačno definisana, optimalna, količina toplotne i mehaničke energije, dobijaju se obrađeni proteini rastvorljivi u vodi koji su lakše dostupni dejstvu proteolitičkih enzima i koji imaju željena funkcionalna svojstva. Istaknut je značaj fenomena kavitacije koji se smatra odgovornim za promenu hemijskih, fizičkih i funkcionalnih osobina ultrazvučno tretiranih uzoraka i dat je pregled najznačajnijih faktora koji utiču na kavitaciju. Takođe, prikazani su do sada utvrđeni uticaji ultrazvučnog tretmana na tehnološko-funkcionalna svojstva proteina iz različitih izvora i napravljen je detaljan pregled literature, koji daje uvid u trenutno stanje u oblasti primene ultrazvuka zajedno sa analizom značajnijih parametara koji utiču na ishod poboljšanja fizičko-hemijskih svojstava različitih proteina. Izložena je i teorijska osnova Ramanove spektroskopije sa relevantnim primerima studija sprovedenih na detekciji promene strukture proteina. Posebna pažnja je posvećena tehnološko-funkcionalnim svojstvima proteina belanceta, koja su potkrepljena relevantnim primerima naučnih studija primene različitih vrsta uređaja za sonikaciju sprovedenih u cilju poboljšanja ovih svojstava. Isto tako, predstavljene su teorijske osnove enzimske hidrolize proteina zajedno sa glavnim problemima koji se javljaju tokom hidrolize. Definisane su najčešće korišćene metode za određivanje stepena hidrolize, kao i faktori koji utiču na samu enzimsku reakciju hidrolize proteina. Predstavljene su važne karakteristike proteaza, uključujući njihovu strukturu, mehanizam delovanja, specifičnost i klasifikaciju. Detaljno su okarakterisane četiri proteaze koje su korišćene kao biokatalizatori u hidrolizi proteina belanceta u okviru ove disertacije. U poglavlju **Materijali i Metode** navedeni su materijali i oprema korišćeni u toku izrade ove disertacije, a zatim su navedene metode korišćene u toku eksperimentalnog rada i obrade rezultata. Prvo su opisani uslovi i metode procesiranja proteina belanceta ultrazvukom u uređajima različite konstrukcije. Potom su opisani načini izvođenja enzimske reakcije hidrolize (jednostepena i dvostepena) proteina belanceta i izveden je empirijski kinetički model na osnovu kog su modelovane dobijene krive hidrolize. Detaljno su opisane i procedure za određivanje funkcionalnih svojstava proteina belanceta, kao i metode određivanja veličine proteinskih frakcija (SDS - PAGE elektroforezom) dobijenih nakon ultrazvučnog pretretmana. Takođe, data je i metoda za određivanje raspodele veličine čestica i polidisperznog indeksa ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta.

Zatim su opisani postupci određivanja površinskih karakteristika različito pretretiranih proteina belanceta. Navedeni su uslovi pri kojima je vršeno sušenje tečnih hidrolizata, kao i metode za određivanje tehnološko-funkcionalnih, senzornih i organoleptičkih svojstava dobijenih prahova. Opisane su i metode za strukturnu i morfološku karakterizaciju ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta i njihovih hidrolizata. Promene u strukturi proteina belanceta nakon primene ultrazvučnog pretretmana određene su primenom Ramanove i FTIR spektroskopije, dok je morfologija određena tehnikom skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja (FE-SEM). U skladu sa mikrobiološkom ispravnosti i bezbednosti proteina belanceta urađene su mikrobiološke analize, a određivanje ukupnog sadržaja mikroorganizama vršeno je na osnovu merenja stepena redukcije broja ćelija u fiziološkom rastvoru u kome su selektovani mikroorganizmi bili izloženi dejstvu različito pretretiranih proteina belanceta.

Poglavlje **Rezultati i diskusija** obuhvata prikaz rezultata dobijenih u eksperimentalnom radu pri izradi ove disertacije, njihovu analizu i diskusiju koja uključuje poređenje sa rezultatima dobijenim u radovima iz literature u sličnim ispitanim sistemima. U poglavlju Rezultati i diskusija nalazi se ukupno 11 potpoglavlja. U **prvom potpoglavlju** prikazani su rezultati uticaja dejstva ultrazvučnih talasa na tehnološko-funkcionalna svojstva nativnih proteina belanceta. Ispitan je uticaj dužine trajanja ultrazvučnog pretretmana izveden u uređajima različite konstrukcije i različitih frekvenci (20, 35 i 40 kHz) na rastvorljivost, kapacitet pene, stabilnost pene i emulgujuća svojstva proteina belanceta. Utvrđen je porast kapaciteta pene, stabilnosti pene, indeksa aktivnosti emulzije i indeksa stabilnosti emulzije nativnih proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (UZS-20kHz), kao i ultrazvukom u kupatilima frekvence 40 kHz i 35 kHz (UZK-40kHz i UZK-35kHz). Vreme pretretmana od 15 min dalo je najbolje rezultate emulgujućih svojstava i svojstava penjenja za sva tri ultrazvučna pretretmana. Najveće povećanje kapaciteta pene, stabilnosti pene, indeksa aktivnosti emulzije i indeksa stabilnosti emulzije zabeleženo je nakon pretretmana ultrazvučnom sondom UZS-20kHz i uočena je zavisnost između stabilnosti pene, indeksa aktivnosti emulzije i indeksa stabilnosti emulzije i dužine pretretmana, dok se kapacitet pene nije statistički značajno menjao ($p > 0,05$) sa promenom vremena pretretmana.

U **drugom i trećem potpoglavlju** ispitan je uticaj dejstva ultrazvučnih talasa različite frekvence na površinske karakteristike molekula proteina belanceta i to sadržaj sulfhidrilnih grupa i stepen hidrofobnosti površine, kao i na raspodelu veličina čestica (agregiranih molekula) proteina. Kako je belance veoma složen sistem koji se sastoji iz više od trideset različitih proteinskih frakcija, da bi se utvrdio mehanizam delovanja ultrazvuka visokog intenziteta na proteine belanceta, takođe je ispitan i uticaj ultrazvuka generisan sondom frekvence 20 kHz na raspodelu veličina čestica i strukturu model proteina belanceta, ovalbumina. Naime, ovalbumin je usvojen kao model protein jer je najviše zastupljen u belancetu (oko 55%). Ova ispitivanja su omogućila značajne uvide u mehanizam delovanja ultrazvuka na proteine belanceta i uspostavljanje korelacija između veličine čestica i njihovog površinskog naelektrisanja i nekih od tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina belanceta poput rastvorljivosti, kapaciteta i stabilnosti pene i emulgujućih svojstava. Tako, dobijena je negativna linearna korelacija između veličine čestica i rastvorljivosti proteina belanceta nakon primene UZS-20kHz, a međusobna zavisnost između indeksa aktivnosti emulzije i indeksa stabilnosti emulzije i veličine čestica je, takođe, potvrđena i ustanovljeno je da sa smanjenjem čestica dolazi do poboljšanja emulgujućih svojstava. Uočena je linearna korelacija između zeta potencijala i ostvarenog povećanja rastvorljivosti proteina belanceta, kapaciteta penjenja i stabilnosti pene nakon ultrazvučnog pretretmana, dok direktna korelacija između zeta potencijala i indeksa emulgujućih svojstava nije ustanovljena.

U **četvrtom potpoglavlju** nastavilo se sa ispitivanjem uticaja ultrazvuka različite frekvence na morfologiju čestica proteina belanceta i dobijeni rezultati su upoređeni sa morfologijom čestica dobijenih nakon primene konvencionalnog termičkog tretmana. U **petom potpoglavlju** prikazana je strukturna analiza različito pretretiranih proteina belanceta i prikazane su promene sekundarne strukture izazvane primenom ultrazvučnog pretretmana. Pokazano je da su ultrazvučni pretretmani proteina belanceta sa sondom UZS-20kHz, kao i u kupatilu UZK-40kHz, uticali na promenu sekundarne strukture proteina, tako što se smanjuje udeo α -zavojnice, ali vidljive su promene i

unutar disulfidnog regiona, čime je potvrđen i objašnjen povećan sadržaj sulfhidrilnih grupa nakon oba ultrazvučna pretretmana. Pri tome, pretretman ultrazvučnom sondom UZS-20kHz pokazao je veći uticaj na strukturna svojstva.

Unutar **šestog potpoglavlja** ispitan je uticaj različitih pretretmana na ukupan sadržaj mikroorganizama prisutnih u tretiranom belancetu. Kako je bezbednost hrane jedan od najvažnijih zahteva koji se nameće proizvođačima, ispitivanje potencijala primene ultrazvuka visokog intenziteta, kao koraka pre enzimske hidrolize umesto tradicionalnog termičkog postupka, važno je i sa aspekta smanjenja broja ili čak uništenja mikroorganizama. Mikrobne kulture koje su korišćene u ovim ispitivanjima bile su: *Salmonella enteritidis* i *Enterobacteriaceae*. Zabeležen je smanjen broj aerobnih bakterija nakon pretretmana sondom UZS-20kHz, dok primenom UZK-35kHz i UZK-40kHz nije zabeleženo smanjenje broja aerobnih bakterija koje formiraju kolonije. Prisustvo *Salmonella enteritidis* i *Enterobacteriaceae* nije detektovano ni u jednom uzorku.

U **sedmom potpoglavlju** izvedena je optimizacija enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta u šaržnom reaktorkom sistemu. U tu svrhu korišćene su različite proteaze u okviru jednostepenog i dvostepenog enzimskog postupka i urađena su preliminarna istraživanja sa aspekta brzine reakcije i prinosa peptida, ali i sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava. Primenom jednostepenog enzimskog postupka, endoproteaza iz *Bacillus licheniformis* (komercijalan naziv alkalaza) se pokazala kao najefikasnija među ispitanim proteazama koje deluju po endo- i egzo-mehanizmu, dok je u dvostepenom enzimskom postupku kombinacija enzima alkalaze i neutraze dala najveće prinose peptida i stepene hidrolize. U svim ispitanim slučajevima enzimska hidroliza je doprinela povećanju rastvorljivosti i svarljivosti proteina belanceta što je od izuzetnog značaja za formulaciju napitaka i proteinskih suplemenata za sportiste, rekreativce i osobe sa poremećenim radom digestivnog trakta na specijalnom dijetetskom režimu ishrane. Pokazano je da su hidrolizati dobijeni iz ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta imali bolja funkcionalna svojstva od onih iz termički pretretiranih, što ukazuje da je ultrazvučni pretretman izazvao promene u strukturi proteina, utičući najpre na povećanje neuređenosti strukture i hidrofobnosti površine (što je potvrđeno u prethodnom poglavlju), što je u određenoj meri sačuvano ili čak povećano nakon dejstva različitih proteaza. Na taj način ultrazvuk je unapredio svojstva penjenja ili emulgovanja hidrolizata. Generalno, u poređenju sa jednostepenom enzimskom hidrolizom, dvostepeni enzimski postupak nije statistički značajno ($p < 0,05$) uticao na poboljšanje funkcionalnih svojstava ultrazvučno pretretiranih hidrolizata, a tretmani sa egzo-peptidazama su se pokazali praktičnim i efikasnim za regulisanje gorčine proteinskih hidrolizata.

U **osmom potpoglavlju** definisani su procesni parametri pri pretretmanu proteina belanceta ultrazvukom koji su optimalni sa aspekta izvođenja enzimske hidrolize, ali i sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina belanceta i njihovih hidrolizata. Kao biokatalizator korišćena je endoproteaza koja se pokazala kao najefikasnija, a to je proteaza iz *B. licheniformis* (alkalaza). U tom smislu ispitan je uticaj frekvence i jačine ultrazvučnih talasa, konstrukcije uređaja za sonikaciju, vremena trajanja samog pretretmana kao i pH rastvora proteina na brzinu enzimske reakcije, ali i tehnološko-funkcionalna svojstva hidrolizata. Pronađeni su optimalni uslovi pretretmana koji su doveli do postizanja visokih prinosa reakcije. Kao najefikasniji pokazao se pretretman ultrazvučnom sondom UZS-20kHz od 15 min pri pH rastvora belanceta 9,2. Ovi rezultati su potpuno u skladu sa utvrđenim promenama u strukturi proteina belanceta usled dejstva ultrazvuka frekvence 20 kHz u toku 15 min. Pri tretmanima sondom dužim od 15 minuta dolazi do značajnog smanjenja brzine enzimske reakcije i neželjenih promena funkcionalnih svojstava kao, na primer, do stvaranja zamućenog, neprovidnog gela usled agregiranja molekula proteina, i usled toga, smanjene rastvorljivosti proteina.

U **devetom potpoglavlju** pokušano je da se kvantitativno odredi uticaj ultrazvuka generisan ultrazvučnom sondom i kupatilima različite snage na brzinu enzimske reakcije. Ispitan je uticaj početne koncentracije enzima i supstrata na brzinu reakcije, pri čemu su eksperimentalno dobijeni podaci modelovani empirijskim kinetičkim modelom koji uzima u obzir inhibiciju supstratom u višku i dezaktivaciju enzima u skladu sa kinetikom drugog reda. Nakon toga, iz empirijske jednačine usvojenog kinetičkog modela, određene su kinetičke konstante metodom linearne

regresije. Najveća konstanta brzine reakcije dobijena je nakon pretretmana ultrazvučnom sondom UZS-20kHz, dok je najmanje povećanje brzine reakcije ostvareno nakon pretretmana UZK-35kHz. Generalno, smanjena inhibicija enzima supstratom, kao i povećanje aktivnosti enzima i brzine reakcije, koji su utvrđeni ispitivanjem kinetike reakcije i određivanjem kinetičkih konstanti, govore da je došlo do unapređenja enzimske hidrolize proteina belanceta pretretiranih sa sva tri različita ultrazvučna pretetmana u poređenju sa kontrolom.

U **desetom potpoglavlju** detaljno su analizirana površinska i strukturna svojstva, kao i tehnološko-funkcionalna svojstva hidrolizata dobijenih sa alkalazom i papainom iz proteina belanceta koji su prethodno tretirani ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz. Konkretno ispitan je uticaj dužine ultrazvučnog pretretmana i vrste enzima na rastvorljivost, svojstva penjenja, emulgaciona svojstva i sadržaj sulfhidrilnih grupa hidrolizata, kao i na stepen hidrofobnosti, zeta potencijal i strukturu peptida u hidrolizatu. Na osnovu dobijenih rezultata, koji su pokazali da hidrolizati dobijeni enzimskom hidrolizom prethodno pretretiranih proteina belanceta ultrazvukom poseduju veću rastvorljivost, kapacitet i stabilnost pene, veće indekse aktivnosti i stabilnosti emulzije u poređenju sa hidrolizatima dobijenim iz intaktnih (netretiranih) proteina belanceta, jasno je da su poboljšana tehnološko-funkcionalna svojstva hidrolizata direktna posledica promene strukture proteina belanceta izazvane ultrazvučnim talasima male frekvence velike snage, čiji je uticaj delimično zadržan i nakon enzimske hidrolize. Međutim, kako dolazi do raskidanja peptidnih veza u molekulu pod dejstvom alkalaze ili papaina u toku hidrolize, naravno da se može pričati samo o kombinovanom uticaju ultrazvuka i enzima.

U **jedanaestom potpoglavlju** prikazani su rezultati optimizacije i izbora tehnika sušenja hidrolizata proteina belanceta. Optimizovan je proces sušenja i dobijeni prahovi su okarakterisani sa aspekta organoleptičkih, funkcionalnih i senzornih svojstava.

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

U poglavlju **Literatura** dat je spisak korišćene literature.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Usled negativnih efekata termičke obrade prirodnih proteina, razvoj inovativnih netermičkih tehnologija i novih metoda, koje će poboljšati tehnološko-funkcionalna svojstva nativnih proteina, predmet su aktuelnih istraživanja. Veća komercijalna primena hidrolizata proteina belanceta je za sada ograničena usled neadekvatnog procesnog tretmana pri obradi i sterilizaciji belanceta kao i hemijskoj hidrolizi proteina, koji dovede do značajne promene boje, ukusa, funkcionalnosti i nutritivnih svojstava proizvoda. Najviše negativnih propratnih efekata ima termički pretretman belanceta na visokim temperaturama pri kojem se odvija složena Majlardova i druge reakcije, što dovodi do tamnjenja proizvoda i nastajanja jedinjenja sa toksičnim, mutagenim i teratogenim efektima. Takođe, tokom termičkog postupka u blago alkalnoj sredini dolazi do neselektivne i nekontrolisane hidrolize proteina, kao i njihove ireverzibilne denaturacije, tako da se značajno smanjuje i nutritivna vrednost proizvoda. Zbog toga, kao alternativa tradicionalnoj termičkoj obradi sve više se ispituju netermički tretmani belanceta i enzimska hidroliza, zbog velikog broja prednosti i dugoročnih efekata proizvodnje koji se mogu postići.

Enzimska hidroliza proteina kao i primena netermičkih tretmana poput tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta svakako nije nov problem i u literaturi postoji veliki broj radova i patenata koji razmatra ovu tematiku. Međutim, u navedenim radovima iz literature uglavnom su korišćeni model proteini belanceta (najčešće lizozim, ovalbumin i ovotransferin). Na osnovu uvida u literaturu,

nema mnogo radova koji se bave primenom netermičkih pretretmana i enzimskom hidrolizom složene smeše proteina prisutnih u belancetu, dok su istraživanja u okviru ove doktorske disertacije upravo bazirana na ispitivanju uticaja ultrazvuka pod različitim uslovima na celokupnu smešu proteina belanceta, što ujedno predstavlja savremenost i originalnost naučnog istraživanja. Istraživanja u okviru ove disertacije su razmatrana sa više aspekata, na primer, zadržavanja odgovarajućih nutritivnih svojstva uz poboljšana tehnološko-funkcionalna i organoleptička svojstva proteina belanceta, što nije jednostavan zadatak i zahtevao je primenu odgovarajućeg ultrazvučnog tretmana, kao i više od jedne proteaze u jednostepenom ili višestepenom enzimskom procesu. Pokazano je da je najefikasnije proteine belanceta fizičko-hemijskim tretmanom „pripremiti“ za enzimsku hidrolizu, odnosno denaturisati, tako da se peptidne veze u unutrašnjosti molekula izlože dejstvu proteaza. Optimizacija enzimskog procesa hidrolize vršena je uz paralelnu optimizaciju ultrazvučnog pretretmana, jer se zna da su intaktni proteini belanceta nedostupni dejstvu proteaza bez prethodnog pretretmana koji može značajno uticati na njihova funkcionalna svojstva. Kako primena pretretmana dovodi do uslošnjanja i poskupljivanja celokupnog procesa, proces optimizacije je pažljivo sproveden kako sa aspekta funkcionalnih svojstava proteina, tako i sa aspekta efekta na samu enzimsku hidrolizu proteina belanceta i ukupne performanse procesa.

Tehnologija primene ultrazvuka visokog intenziteta (frekvenci od 16 do 100 kHz) može biti vrlo korisna kod minimalnog procesiranja proteinskih sirovina, jer se ograničava povišenje temperature tokom tretmana, i time omogućava očuvanje senzornih i nutritivnih svojstava komponenata. Mali broj radova, koji se bave problematikom tretiranja proteina belanceta ultrazvukom pre enzimske proizvodnje hidrolizata, ne razmatraju tehnološko-funkcionalna svojstva dobijenih proizvoda, kao ni uticaj pretretmana na strukturu i funkcionalnost proteina belanceta, već samo uticaj ultrazvuka na samu enzimsku reakciju. Veoma je važno da u toku pretretmana ne dođe do neželjenih promena funkcionalnih svojstava kao, na primer, do stvaranja zamućenog, neprovidnog gela usled agregiranja molekula proteina, i usled toga smanjene rastvorljivosti proteina. Poznato je da tretiranje proteina ultrazvukom može dovesti do ovih neželjenih promena pod određenim uslovima, ali je, generalno, mehanizam delovanja ultrazvuka na proteine drugačiji nego mehanizam delovanja toplotom. Polazeći od činjenice da ultrazvuk značajno utiče na sekundarnu, tercijarnu i kvaternarnu strukturu proteina, od kojih je tercijarna izuzetno važna za funkcionalnost proteina, kao i da dovodi do povećanja hidrofobnosti površine i broja sulfhidrilnih grupa na površini molekula koje su odgovorne za veći broj disulfidnih mostova i formiranje manjih agregata nego pod uticajem toplote, objašnjava se zašto se pod dejstvom ultrazvuka dobijaju rastvorljiviji proteini, veće konformacione pokretljivosti i dostupnosti proteazama. Takođe, neophodno je obratiti pažnju na frekvenciju i jačinu ultrazvučnih talasa, vrstu i konstrukciju uređaja za sonikaciju, kao i na vreme trajanja samog pretretmana.

Vodeći se gore pomenutim stavkama, u okviru ove doktorske disertacije definisani su procesni parametri pri pretretmanu proteina belanceta ultrazvukom koji su optimalni sa aspekta izvođenja enzimske hidrolize, ali i sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina belanceta i njihovih hidrolizata. Osnovni cilj ove disertacije je bio da se doprinese razvoju enzimskog procesa hidrolize proteina belanceta i optimizaciji ultrazvučnog pretretmana kao adekvatnoj zameni za tradicionalni termički pretretman procesiranja proteina hrane u prehrambenoj industriji čime su ispunjeni zahtevi za savremenost i originalnost naučnog istraživanja sprovedenog u okviru ove disertacije.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

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

Citirana su 457 literaturna navoda koja su omogućila da se jasno predstavi stanje u ispitivanoj naučnoj oblasti, kao i da se sagleda aktuelnost problematike. Većinu pregledane literature čine radovi publikovani u vrhunskim međunarodnim časopisima od strane eminentnih stručnjaka u ispitivanoj naučnoj oblasti. Na osnovu ovog preseka stanja u literaturi izložene su osnovne smernice

za istraživanja koja su sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji. Iz obrazloženja predložene teme doktorske disertacije i objavljenih radova u prijavi, koju je kandidat podneo, kao i iz popisa literature koja je korišćena u istraživanju, uočava se adekvatno poznavanje predmetne oblasti istraživanja, kao i poznavanje aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

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

Promene u strukturi proteina belanceta nakon ultrazvučnog pretretmana praćene su pomoću Ramanove i FTIR spektroskopije. Kao kontrolni uzorak korišćen je osušeni netretirani vodeni rastvor proteina belanceta. 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 ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$). Raspodela veličine čestica i polidesperzni indeks proteina belanceta nakon odgovarajućih ultrazvučnih pretretmana određeni su primenom tehnike dinamičkog rasipanja svetlosti pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Isti uređaj korišćen je za određivanje zeta-potencijala ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta dajući informaciju o meri stabilnosti čestica unutar datog sistema. Površinska hidrofobnost ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta određena je spektrofotometrijski pomoću sprektrofluorimetra (Horiba FluoroMax[®]4) prema modifikovanoj metodi iz literature.

Enzimaska reakcija hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta izvedena je u šaržnom reaktoru sa automatskom kontrolom temperature $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i vrednosti pH $\pm 0,1$ uz kontrolisano mešanje i ostale hidrodinamičke uslove. Napredovanje i tok enzimske reakcije praćen je na osnovu stepena hidrolize koji je direktno proporcionalan količini α -amino grupa koje se oslobode u toku reakcije i količini utrošene baze za održavanje konstantne pH vrednosti. Uklanjanje soli iz hidrolizata nakon završene hidrolize obavljeno je procesom dijalize pomoću creva za dijalizu. U cilju dobijanja praškastih proizvoda svi hidrolizati osušeni su tehnikom sprej sušenja i liofilizacijom i ispitan je uticaj sprej sušenja i sušenja liofilizacijom na tehnološko-funkcionalna svojstva finalne formulacije proizvoda. Sva ispitivanja izvedena su prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature.

Morfologija ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta i njihovih hidrolizata određena je tehnikom skenirajuće elektronske mikroskopije pomoću elektronskog mikroskopa (TESCAN MIRA3 XMU). Od tehnološko-funkcionalnih i fizičko-hemijskih svojstava pretretiranih proteina i hidrolizata u okviru ove doktorske disertacije razmatrani su: kapacitet i stabilnost pene, emulgaciona svojstva, rastvorljivost, odnos ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa i reaktivnih grupa na površini molekula, svarljivost, redukujuća moć. Rastvorljivost proteina belanceta određena je spektrofotometrijski. Kapacitet i stabilnost pene ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta i njihovih hidrolizata određena je na uređaju (Yellowline, DI 25 basis, Ica Works Inc., Wilmington, 600 W, 50 V, 8000-24000 rpm). Ovaj metod se sastoji u snažnom mešanju uzorka na konstantnoj temperaturi i pri konstantnom velikom broju obrtaja, što prouzrokuje stvaranje pene, i očitavanju visine pene posle zaustavljanja mešanja. Kapacitet penjenja se izražava kao relativno povećanje zapremine odmah nakon završetka mešanja, dok se stabilnost pene izražava kao relativno povećanje zapremine pene 30 minuta nakon završetka mešanja. Emulgaciona svojstva određena su spektrofotometrijskom metodom i izražena su kroz indekse emulgacione aktivnosti i emulgacione stabilnosti. Svarljivost i redukujuća moć merena su spektrofotometrijski prema modifikovanim metodama iz literature. Gorčina hidrolizata, koji su prethodno osušeni sprej sušenjem i/ili liofilizacijom, određena je na osnovu subjektivnog osećaja šest individua pri koncentraciji peptida 30 mg cm^{-3} i izražena je u jedinicama koncentracije rastvora kofeina iste gorčine. Merenje koordinata boje osušeni i tabletiranih hidrolizata belanceta (CIE, L^* , a^* , b^*) određeno je pomoću Datacolor SF300 UV refleksionog spektrofotometra, koristeći izvor svetlosti D65 pri standardnom uglu posmatrača od

10°. Sadržaj pepela, lipida, proteina i ukupnih ugljenih hidrata određen je pomoću AOAC standardnih metoda. Distribucija molekulske mase hidrolizata određena je metodom SDS-PAGE elektroforeze koja se izvodila u jedinici za horizontalnu i vertikalnu elektroforezu (Amersham Biosciences).

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Na osnovu pregleda do sada objavljenih eksperimentalnih podataka i rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije, ostvaren je značajan doprinos u mogućnosti implementacije ultrazvučnog pretretmana sa ciljem poboljšanja tehnološko-funkcionalnih svojstava nativnih proteina belanceta i hidrolizata proteina belanceta. Rezultati dobijeni u toku rada na ovoj doktorskoj disertaciji daju značajan naučni doprinos objašnjenju mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa, kako na strukturu kompleksne smeše proteina belanceta, tako i na strukturu model proteina, ovalbumina. Na osnovu definisanog uticaja ultrazvuka određene frekvence i snage pod kontrolisanim uslovima (održavanje konstantne temperature, jonske jačine, pH rastvora) na površinske karakteristike molekula proteina belanceta poput hidrofobnosti površine i zeta potencijala, kao i njihovih funkcionalnih svojstava, uspostavljene su važne korelacije na osnovu kojih se može teoretski predvideti uticaj ultrazvuka na rastvorljivost, kapacitet pene i stabilnost pene. Nažalost, nije uspostavljena korelacija između emulgujućih svojstava sa površinskim karakteristikama molekula proteina, kao ni sa veličinom čestica (stepena agregacije), ali je utvrđen veliki uticaj promene sekundarne strukture na emulgujuća svojstva. Primena različitih ultrazvučnih uređaja, sa opsegom frekvenci od 20-40 kHz, kao i variranje uslova izvođenja samog pretretmana (snaga ultrazvučnih talasa, dužina trajanja pretretmana, radna temperatura) izazvala je velike promene u strukturi proteina nastale usled kavitacionog dejstva ultrazvučnih talasa, formiranja/razlaganja agregata proteina, kao i promene morfologije i veličine čestica pretretiranih proteina. Sinergistički efekat ultrazvučnog pretretmana i naknadne enzimske hidrolize detaljno je objašnjen i njihov uticaj na poboljšana funkcionalna svojstva proteina belanceta smatra se značajnim doprinosom u razumevanju mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa na denaturaciju proteina. Razvijena metoda ultrazvučnog pretretmana i naknadne enzimske hidrolize se može smatrati pogodnim izborom za potrebe dobijanja ekonomski isplativih količina funkcionalnih hidrolizata iz proteina belanceta. Dobijeni hidrolizati poseduju unapređena funkcionalna svojstva, u toj meri dovoljna, da se mogu koristiti kao aditivi hrani i/ili dijetetski suplementi. Finalni rezultat disertacije je potpuno okarakterisan hidrolizat proteina belanceta u formi praha koji kao takav ima veliki potencijal za različite primene. Rezultati i zaključci izneti u ovoj disertaciji predstavljaju osnovu za dalji razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda na bazi proteina belanceta.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

Kandidat Andrea Stefanović, master inženjer tehnologije, je tokom izrade doktorske disertacije ispoljila izuzetnu stručnost u pripremi i realizaciji eksperimenata i korišćenju različitih tehnika i metoda, a pri analizi rezultata je pokazala samostalnost, sistematičnost i kreativnost. Na osnovu dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalni naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Glavni naučni doprinos ove doktorske disertacije predstavlja razvoj inovativnog tehnološkog postupka koji se koristi na kombinovanoj primeni ultrazvuka određene frekvence i intenziteta i parcijalne enzimske hidrolize za dobijanje hidrolizata proteina belanceta određenih tehnološko-funkcionalnih svojstava, koji podrazumeva nekoliko pojedinačnih doprinosa:

- Nova saznanja o mogućnosti primene ultrazvučnog pretretmana za obradu proteina belanceta nasuprot konvencionalnom termičkom tretmanu;
- Optimizacija procesnih parametara pri obradi proteina belanceta ultrazvukom visokog intenziteta sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina, kao i brzine konsekutivne enzimске hidrolize;
- Definisanje uticaja ultrazvučnog pretretmana pri različitim uslovima na strukturu, površinske karakteristike i tehnološko-funkcionalna svojstva proteina belanceta;
- Definisanje uticaja specifičnosti endo- i egzoproteaza na tehnološko-funkcionalna svojstva hidrolizata proteina belanceta u jednostepenim (dejstvo jedne proteaze) i dvostepenim (dejstvom dve proteaze) enzimskim procesima;
- Uvid u mehanizam delovanja ultrazvuka na proteine belanceta i uspostavljanje korelacija između veličine čestica i njihovog površinskog naelektrisanja i nekih od tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina belanceta poput rastvorljivosti, kapaciteta i stabilnosti pene i emulgujućih svojstava;
- Podešavanje procesnih parametara enzimске hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu;
- Ispitivanje kinetike enzimске reakcije hidrolize proteina u cilju dobijanja projektnih jednačina neophodnih za projektovanje i dizajn šaržnog enzimskog reaktora za proizvodnju hidrolizata proteina belanceta;
- Optimizovan je proces sprej sušenja u cilju dobijanja spršenih hidrolizata proteina belanceta željenih karakteristika;
- Potpuno okarakterisan hidrolizat proteina belanceta u tečnoj formi i osušen u vidu praha.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Pregledom dostupne literature iz ove oblasti istraživanja koja razmatra enzimске procese za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane, kao i razmatranjem rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji, uočava se da rezultati iz ove doktorske disertacije značajno dopunjuju postojeća saznanja iz pomenute oblasti. Naime, optimizacijom ključnih reakcionih faktora i uspešnom imlementacijom ultrazvučnog pretretmana, značajno su unapređena tehnološko-funkcionalna svojstva proteina belanceta, a ujedno i povećana efiksnost enzimске hidrolize. Razvojem efikasnog enzimskog postupka u šaržnom reaktorskom sistemu, kao i uspostavljanjem odgovarajućeg kinetičkog modela postavljeni su osnovi za uvećanje razmera i automatizaciju procesa dobijanja hidrolizata proteina belanceta sa tačno definisanim funkcionalnim svojstvima. Poseban značaj ima odabir odgovarajuće tehnike sušenja tečnih hidrolizata u cilju dobijanja spršenih hidrolizata proteina belanceta željenih karakteristika.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Andrea Stefanović je rezultate istraživanja dobijene u okviru izrade svoje doktorske disertacije potvrdila objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog značaja i saopštenjima na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Rezultati istraživanja proistekli iz ove disertacije objavljeni su do sada u okviru tri rada u naučnim časopisima međunarodnog značaja (kategorizacije M21-jedan rad, M22-jedan rad i M24-jedan rad), jedan rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51) i trinaest saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima od kojih su pet štampani u celini. Kandidat se tokom izrade disertacije bavio istraživačkim radom u okviru uže naučne oblasti biohemijskog inženjerstva i biotehnologije u okviru kojih je koautor još sedam radova u časopisima međunarodnog značaja, dva rada u časopisima nacionalnog značaja, poglavlju u monografiji vodećeg međunarodnog značaja i dvanaest saopštenja na skupovima međunarodnog ili nacionalnog značaja.

Kategorija M21:

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

Kategorija M22:

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

Kategorija M24:

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

Kategorija M51:

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

Kategorija M33:

1. Zorica D. Knežević-Jugović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Mirjana G. Antov, Picazo Espinosa Rafael, Verica Manojlović, Branko Bugarski. Enzymatic Production of Bioactive Protein Hydrolysates from Egg White: Effects of Egg White Protein Pretreatment, *Proceedings of the 39th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 21-25. May, 2012, Proceedings, pp. 1419-1425 (ISBN 978-80-89475-04-9).
2. Z. Knežević-Jugović, **A. Stefanović**, M. Žuža, B. Jugović, M. Gvozdenović, M. Antov, B. Bugarski. Functionality and antioxidant properties of hydrolysates of egg white proteins as influenced by type of protease, *Proceedings of the 3rd International Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, M. Gligorić, ed., Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 4-6. March, 2013, Proceedings, pp. 678-685 (ISBN 978-99955-81-11-4).
3. Zorica Knežević-Jugovic, Ana Gluovic, Milena Žuža, **Andrea Stefanovic**, Milica Gvozdenovic, Branimir Jugovic, Mirjana Antov. Effects of hydrolysis degree and type of protease on antioxidant activity and functionality of egg white protein hydrolysates, *Proceedings of the 40th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 27-31. May, 2013, Proceedings, pp. 1432-1439 (ISBN 978-80-89475-09-4).
4. Knezevic-Jugovic, Z., **Stefanovic, A.**, Jovanovic, J., Zuza, M., Grbavcic, S., Jakovetic, S., Dojcinovic, M., Lukovic, N. Ultrasound-induced changes in functional properties of egg white proteins and in their susceptibility to enzymatic hydrolysis, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 41st International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, 26-30 May 2014, pp. 126–135 (ISBN 978-80-89475-13-1).

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

Kategorija M34:

1. **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Ana Gluvić, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović. Kinetic model of the hydrolysis of egg white proteins by Alcalase, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., pp. 235., CD Proceedings (ISBN 987-86-7132-053-5.)
2. Zorica Knežević-Jugović, Milena Žuža, Ana Gluvić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Verica Manojlović, Branko Bugarski. Biochemical and functional properties of egg white hydrolysates produced by different proteases, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., pp. 232. CD Proceedings (ISBN 987-86-7132-053-5).
3. Nevena Luković, Sonja Jakovetić, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Nataša Šekuljica, Zorica Knežević-Jugović. Production of antioxidative egg-white hydrolysates in a circle batch membrane reactor, *7th Central European Congress Food-CEFood, Food Chain Intergadion*, Ohrid, Macedonia, 21-24 May 2014, Book of Abstract, pp. 220 (ISBN 987-608-4565-05-5).
4. Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Nataša Šekuljica, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović. Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis, *Food Quality & Safety, Health & Nutrition 1st Conference*, 27-29 November 2014, Skopje, Macedonia, Book of Abstract, pp. 76 (ISBN 978-608-4565-06-2).
5. Knežević-Jugović, Z., Jovanović, J., **Stefanović, A.**, Jakovetić, S., Grbavčić, S., Elmalimadi, M., Bugarski, B. Hydrolysis of egg white and wheat proteins with protease from *Bacillus licheniformis*: fractionation and identification of bioactive peptides, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, 25-29 May 2015, pp.753–753 (ISBN 978-80-89475-14-8).
6. **Stefanović, A. B.**, Jovanović, J. R., Šekuljica, N. Ž., Grbavčić, S. Ž., Luković, N. D., Bugarski, B. M, Knežević-Jugović, Z. D. Structural and functional characterization of papain-assisted ultrasound pretreated egg white hydrolysis, *2nd International Conference on Ultrasound-based Applications: from analysis to synthesis - ULTRASONICS 2016*, Caparica-Almada, Portugal, 6th-8th June 2016, Book of Abstracts, pp. 43 (ISBN 978-989-99361-9-5).

Kategorija M63:

1. **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Ana D. Gluvić, Verica B. Manojlović, Dejan I. Bezbradica, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from egg white: effects of ultrasound on egg white proteins, *50. Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, CD sa objavljenim radovima, Beograd, 2012, BT P3, pp. 186-190 (ISBN 978-86-7132-049-8).
2. Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Milena Žuža, Nataša Šekuljica, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Zorica Knežević-Jugović. Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije, u: Vladimir Dosković i

Dušan Marković (ur.): *XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak 07-08. Mart 2014., Zbornik radova, vol. 19, no. 21, pp. 281-285 (ISBN 987-86-87611-31-3).

Kategorija M94:

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

Ostali naučni radovi kandidata

Kategorija M21a

1. Abdalla Ali Salim, Sanja Ž. Grbavčić, Nataša Ž. Šekuljica, **Andrea B. Stefanović**, Sonja M. Jakovetić Tanasković, Nevena D. Luković, Zorica D. Knežević-Jugović. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods, *Bioresource Technology*, vol. 228, pp. 193–200, 2017 (**IF=5.651**) (ISSN 0960-8524).

Kategorija M21:

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

Kategorija M22:

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

Kategorija M23:

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

properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration, *Hemijska industrija*, vol. 70, pp. 419-428, 2016 (**IF=0,459**) (ISSN 0367-598X).

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

Kategorija M51:

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

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. The oxidation of anthraquinone dye using HRP immobilized as a cross-linked enzyme aggregates, *Advance Technology*, vol. 5, no. 2, pp. 18-26, 2016 (ISSN 2406-2979).

Kategorija M33:

1. Zorica D. Knežević-Jugović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Milena G. Žuža, Nataša Ž. Šekuljica, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski. Antioxidant activity of peptide fractions obtained by membrane ultrafiltration of egg white protein enzymatic hydrolysates, Editor: Gligorić, M., In *Proceedings of the IV Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04-06. march 2015, pp. 278-287, CD Proceedings (ISBN 978-99955-81-18-3).
2. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, **Andrea B. Stefanović**, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović. Kaolin as a support for the immobilization of horseradish peroxidase: application in anthraquinonic dyes decolorization from wastewater, Editor: Gligorić, M., In *Proceedings of the IV Congress: "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04-06. march 2015, pp. 287-292, CD Proceedings (ISBN 978-99955-81-18-3).
3. Jovanović, J., **Stefanović, A.**, Grbavčić, S., Šekuljica, N., Elmalimadi, M., Bugarski, B., Knežević- Jugović, Z.: Peptides with improved antimicrobial activity screened by membrane ultrafiltration from egg white protein hydrolysates, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, 25-29 May 2015, pp. 732–739 (ISBN 978-80-89475-14-8).
4. Elmalimadi M., **Stefanović, A.**, Jovanović, J., Šekuljica, N., Tanasković, S., Antov, M., Knežević-Jugović, Z. Functional improvements in wheat gluten through alcalase-assisted hydrolysis and thermal pretreatment, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 43th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, 23-27 May 2016, pp. 874–882 (ISBN 978-80-89597-35-2).
5. Zorica Knežević-Jugović, Mohamed Elmalimadi, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Sonja Jakovetić Tanasković, Branko Bugarski. Antioxidant properties of hydrolysates of wheat gluten as influenced by process conditions, *V međunarodni kongres "Inženjerstvo, ekologija i materijali u procesnoj industriji"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 15-17. mart 2017, pp. 145-153 (UDK: 633.11:543.384).

Kategorija M34:

1. M. Carević, M. Stojanović, M. Mihailović, **A. Stefanović**, S. Grbavčić, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica. The immobilization of β -galactosidase on chemically modified immobilization supports, *2nd FCUB Workshop Food Technology and Biotechnology*, 18.-19. oktobar 2011, Beograd, P-26.
2. Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, **Andrea Stefanović**, Milica Carević, Zorica Knežević-Jugović. The kinetic study of oleyl cinnamate synthesis, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Beograd, 27-29. jun 2013., pp. 246., CD Proceedings (ISBN 987-86-7132-053-5).
3. Aleksandra Đukić-Vuković, Dragana Mladenović, **Andrea Stefanović**, Jelena Jovanović, Zorica Knežević-Jugović, Jelena Pejin, Ljiljana Mojović. Ultrasound-assisted pretreatment of distillery stillage for lactic acid production, *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Field in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies* (incorporating The 3rd International Bio & Food Electrotechnologies Symposium and Bioelectrics 2015 - The 12th International Bioelectrics Symposium), Portorož, Slovenia, 6-10 September 2015, Wed-C1-P7, Programme and book of abstracts, pp. 112 (ISBN 978-961-243-284-3).
4. Nataša Ž. Šekuljica, Nevena Ž. Prlainović, **Andrea B. Stefanović**, Jelena R. Jovanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović. Dekolorizacija antrahinonskih boja iz otpadnih voda imobilisanom peroksidazom iz rena, *XI simpozijum „Savremene tehnologije i privredni razvoj*, Zbornik radova, 2015, pp. 67, Leskovac.
5. Jovanović, J. R., **Stefanović, A. B.**, Šekuljica, N. Ž., Grbavčić, S. Ž., Jakovetić Tanasković, S. M., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D. Antibacterial and antioxidant capacity of egg white hydrolysates screened from proteolysis-assisted high intensity ultrasound treatment, *2nd International Conference on Ultrasound-based Applications: from analysis to synthesis - ULTRASONICS 2016*, Caparica-Almada, Portugal, 6th-8th June 2016, Book of Abstracts, pp. 62 (ISBN 978-989-99361-9-5).

Kategorija M63:

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

Kategorija M13:

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

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu prethodno iznetih razmatranja rezultata doktorske disertacije Andree Stefanović, master inž. tehnologije pod nazivom „Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenta funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta” smatramo da su ispunjeni svi ciljevi i zadaci rada na ovoj tezi i da ona svojim sadržajem i kvalitetom značajno doprinosi oblasti Tehnološko inženjerstvo, što je i potvrđeno objavljivanjem

radova u međunarodnim časopisima, kao i publikovanjem rezultata na konferencijama od međunarodnog i nacionalnog značaja. Takođe, komisija je mišljenja da je kandidat ispoljio izuzetnu naučnoistraživačku sposobnost u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da se doktorska disertacija pod nazivom „Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta” kandidata Andree Stefanović prihvati, izloži na uvid javnosti i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu. Takođe, da se nakon završetka ove procedure, kandidat pozove na usmenu odbranu doktorske disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

ČLANOVI KOMISIJE

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

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

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

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

Dr Sanja Grbavčić, naučni saradnik,
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu