

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata **Salem Mohamed Embiriekah**, master inženjera

Odlukom br. 35/194 od 31.05.2018. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata **Salem Mohamed Embiriekah** pod naslovom

„Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim putem“

„Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“

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

REFERAT

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

Školske 2013/2014 - Salem Mohamed Embiriekah, master inž. upisuje doktorske akademske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom dr Marice Rakin, redovnog profesora Tehnološko-metalurškog fakulteta. Rešenjem rektora Univerziteta u Beogradu broj 06-61302-5994/5-13 dana 02.07.2014. godine studentu je priznata visokoškolska isprava drugog nivoa visokog obrazovanja stečena na Univerzitetu u Misurati, Libija, izdata 03.06.2014. godine, čime je stekao pravo upisa na doktorske akademske studije, studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija.

13.02.2017. - Salem Mohamed Embiriekah, master inž. je Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta predložio temu doktorske disertacije pod nazivom „Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim putem“ („Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“).

23.02.2017. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, odlukom br. 35/22, imenovana je Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije kandidata Salem Mohamed Embiriekah, master inž.

06.07.2017. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, odlukom br. 35/253 usvojen je izveštaj Komisije za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije pod nazivom „Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim

putem“ („Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“), kandidata Salem Mohamed Embiriekah, master inž. Za mentora doktorske disertacije imenovana je dr Marica Rakin, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta.

28.08.2017. - Odlukom br. 61206-3121/2-17, Veće naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu daje saglasnost na predlog teme doktorske disertacije kandidata Salem Mohamed Embiriekah, master inž. pod nazivom „Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim putem“ („Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“).

31.05.2018. - Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, odlukom br. 35/194, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Salem Mohamed Embiriekah, master inž. pod nazivom „Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim putem“ („Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“).

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove doktorke disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, za koju je matična ustanova Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Mentor ove doktorske disertacije, dr Marica Rakin, 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

Salem Mohamed Embiriekah je rođen 25. maja 1972. godine u Libiji gde je završio osnovnu i srednju školu. Diplomirao na studijskom programu Hemija na Fakultetu prirodnih nauka, Univerziteta u Misurati 1995. godine. Master akademske studije je završio na hemijskom odseku Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Misurati 2009. godine. U periodu 2009-2012 godine bio je predavač na predmetu Analitička hemija na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Misurati. U periodu od 2011. do 2013. godine, Salem Embiriekah je izvodio teorijsku i praktičnu nastavu na predmetima Biohemija i Organska Hemija na Pedagoškom fakultetu u Libiji. Univerzitet u Beogradu sproveo je proces priznavanja i evaluacije studijskog programa, izvršio nostrifikaciju 03. juna 2014. godine i izdao dokument na ime Salem Mohameda Embiriekaha za drugi nivo visokog obrazovanja stečen na Univerzitetu u Misurati, Libija. U periodu 2012/2013 započeo je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na odseku za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, pod rukovodstvom prof. dr Marica Rakin, redovniog profesora Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija položio je sa prosečnom ocenom 9,58. Govori i piše engleski.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija kandidata Salem Mohamed Embiriekah je napisana na 141 strani u okviru kojih se nalazi 5 poglavlja, 9 tabela, 39 slika i 161 literaturni navod. Doktorska disertacija sadrži poglavlja: *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Zaključak* i *Literatura*. Na početku disertacije dat je *Rezime* na engleskom i srpskom jeziku, a na kraju disertacije nalazi se *Biografija*

kandidata na srpskom i engleskom jeziku i tri obavezna *Priloga*: Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i Izjava o korišćenju. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde Univerziteta u Beogradu za doktorsku disertaciju.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U poglavlju **Uvod**, naveden je predmet istraživanja ove disertacije koji se odnosi na iskorišćavanje surutke i njeno prevođenje, primenom postupka mlečno-kisele fermentacije i enzimske hidrolize, u nove proizvode na bazi surutke unapređenih funkcionalnih svojstava. Ukazano je na značaj iskorišćavanja otpadne surutke i njenog uključivanja u ishranu ljudi.

U poglavlju **Teorijski deo**, nalazi se ukupno 8 potpoglavlja. U prvom potpoglavlju dat je kratak pregled o stanju i perspektivi proizvodnje i iskorišćavanja surutke kao otpadnog proizvoda mlečne industrije. U drugom potpoglavlju opisan je proces dobijanja surutke, njen sastav i svojstva. U trećem potpoglavlju prikazan je sastav proteinskih frakcija surutke koje su detaljno opisane u pogledu porekla, svojstava i značaja. U četvrtom potpoglavlju predstavljen je značaj proteinskih frakcija surutke u pogledu njihovih funkcionalnih svojstava. U petom potpoglavlju izneti su podaci koji se odnose na mogućnosti biotehnoške transformacije proteina surutke, primenom procesa mikrobne fermentacije i enzimske hidrolize, u unapređenje funkcionalne proizvode. U šestom potpoglavlju dat je pregled potencijalnih bioaktivnih peptida surutke koji mogu biti proizvedeni primenom različitih biotehnoških procesa, opisan je takođe značaj primene bioaktivnih peptida surutke na zdravlje ljudi kao i njihova ulogu surutke u prevenciji i lečenju bolesti, čime je još jednom istaknut značaj uključivanja ovih proizvoda u ishranu ljudi. U sedmom potpoglavlju posebno je istaknut značaj i mehanizam dejstva antioksidativnih peptida surutke proizvedenih biotehnoškom modifikacijom proteina surutke. U osmom potpoglavlju opisane su mogućnosti primene bioaktivnih peptida surutke u prehrambenim i neprehrambenim proizvodima.

U poglavlju **Eksperimentalni deo**, nalazi se ukupno 4 potpoglavlja. U svakom od potpoglavlja navedeni su materijali, mikroorganizmi, enzimi, hemikalije p.a. čistoće i uređaji korišćeni u eksperimentalnom radu. Navedene su sve metode korišćene za pripremu mikroorganizama, podloga za gajenje mikroorganizama i korišćenih sirovina. Opisane su metode i uslovi izvođenja postupaka mikrobne fermentacije i enzimske hidrolize surutke, primenjivane u eksperimentalnom radu, i navedene su sve metode korišćene za određivanje parametara kvaliteta proizvedenih hidrolizata. Detaljno su opisane metode određivanja: antioksidativne aktivnosti (DPPH), redukcione snage (FRAP), emulgujućih svojstava, svojstava penjenja, digestibilnosti, bioraspoloživosti, stepena hidrolize, sadržaja proteina i aminokiselina, sposobnosti stabilizacije membrane eritrocita, sposobnosti inhibicije denaturacije proteina, sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije, antimikrobne aktivnosti, kao i stabilnosti, nutritivnih karakteristika finalnog proizvoda u kome su proizvedeni hidrolizati primenjeni. U okviru potpoglavlja *Modifikacija proteina surutke primenom procesa mikrobne fermentacije* iznet je zaključak: Povećana antioksidativna aktivnost je postignuta u svim testiranim kombinacijama sojeva i supstrata. Visoki nivoi antioksidativnih aktivnosti u opsegu 29,7-72,2% su postignuti na svim supstratima fermentisanim primenom *Lb. rhamnosus* soja. Među svim kombinacijama, kozja surutka fermentirana sojem *Lb. rhamnosus* pokazala najveći porast DPPH aktivnosti (za 21,1%), kao i FRAP antioksidantne aktivnosti (za 0,761 mmol Fe²⁺/L) u poređenju sa nefermentisanim supstratom. Stoga, studija uvodi *Lb. rhamnosus* kao visoko efikasan u proizvodnji antioksidanata tokom fermentacije kozje surutke. Štaviše, kozja surutka fermentisana sojem *Lb. rhamnosus*, koja se može koristiti u tečnom ili liofilizovanom obliku, može biti odličan nosač antioksidanata koji se kao takvi mogu primeniti u različitim mlečnim i prehrambenim proizvodima. S druge strane, kravlja surutka fermentisana sojem *Lb. rhamnosus* je pokazala DPPH aktivnost od 57,3%, kao i FRAP antioksidativnu aktivnost od 0,862 mmol Fe²⁺/L. Analizirajući istovremeno rezultate koji se odnose na funkcionalne osobine hidrolizata, može se primetiti da hidrolizat kravlje surutke ispunjava ovaj važan kriterijum primjene. Naime, u odnosu na kozju surutku, hidrolizat kravlje surutke pokazao je

značajno bolju emulgujuću aktivnost (98,2%), stabilnost emulzije (68,2%), aktivnost pene (307,1%), digestibilnost (96,9%) i bioraspoloživost (120,6%) ključnih parametara njegove primena. Pored toga, u poređenju sa kozjom surutkom, kravja surutka je mnogo pristupačniji, i obimniji otpadni proizvod industrije mleka pa je njegova upotreba mnogo značajnija. Stoga, ispitivanjem svih ovih činjenica, može se zaključiti da proces mikrobne fermentacije kravlje surutke sojem *Lb. rhamnosus* ATCC 74696 predstavlja odgovarajući proces za proizvodnju bioaktivnih komponenti. Predložena kombinacija soja i supstrata omogućava proizvodnju bioaktivnih peptida sa visokom antioksidativnom aktivnošću, kao i iskorišćavanje kravlje surutke kao otpadnog proizvoda koji se javlja u vrlo velikoj količini. U okviru potpoglavlja *Modifikacija proteina surutke primenom procesa enzimske hidrolize* iznet je zaključak: Hidroliza proteina surutke primenom tripsina omogućava oslobađanje peptida sa visokom antioksidativnom aktivnošću, poreklom iz matičnih proteina surutke kao složene prehrambene matrice. Tripsin hidrolizat sa maksimalnom ukupnom antioksidativnom aktivnošću od 80,0% može se proizvesti nakon 4h hidrolize na 37 °C i odnosom E/S od 0,5%. Tripsin hidrolizat pokazao je za 47,9% veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa nehidrolizovanim proteinima surutke, kao i za 25,9% veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa pepsin hidrolizatom proizvedenim pod istim uslovima. Hidrolizat tripsina, koji se uglavnom sastoji od hidrofilnih (polarnih aprotičnih) antioksidativnih vrsta, ostvario je poboljšanu digestibilnost od 95,9% i bioraspoloživost od 124,6%, u poređenju sa prirodnim proteinima surutke i pepsin hidrolizatom. Pored svojih dobrih antioksidativnih svojstava, tripsin hidrolizat je imao odlične funkcionalne osobine, kao što su sposobnosti emulgovanja i pjenja. Ova svojstva pokazuju da je to poželjna sirovina za prehrambenu industriju koja bi mogla zameniti proteine surutke kao tradicionalne aditive za proizvodnju prehrambenih proizvoda. Na osnovu poboljšanih osobina, tripsin hidrolizat se može smatrati odličnim nosačem za unošenje antioksidanata koji doprinose kako zdravlju, tako i funkcionalnim svojstvima mlečnih ili konditorskih proizvoda. Glavni doprinos ovog dela istraživanja bio je određivanje antioksidativne aktivnosti peptida različitih polariteta, što je doprinelo preciznom određivanju ukupne antioksidativne aktivnosti nastalih hidrolizata. Ova detaljna analiza antioksidativne aktivnosti omogućava precizan izbor optimalnih uslova za proizvodnju hidrolizata sa maksimalnom antioksidativnom aktivnošću. Hidrofilna priroda njegove antioksidativne aktivnosti pokazuje da je tripsin hidrolizat prirodni sastojak najpogodniji za sprečavanje procesa oksidacije u polarnim prehrambenim proizvodima. Visoka bioraspoloživost sugeriše na očuvanu biološku aktivnost peptida tokom procesa gastrointestinalne digestije, što je poseban izazov u pogledu primene takvih aditiva. U okviru potpoglavlja *Proizvodnja sprej sušenih bioaktivnih hidrolizata proteina surutke* iznet je zaključak: Na osnovu rezultata predstavljenih za različite bioaktivnosti hidrolizata u prahu proizvedenog primenom tripsina, može se naglasiti da dodavanje najmanje 178.4 mg mL⁻¹ hidrolizata proteina surutke može inhibirati proces lipidne peroksidacije za 50%, kao i mikrobiološku kontaminaciju izazvan *S. aureus* ATCC25923, *B. cereus* ATCC 11778 i *L. monocitogenes*. Pored toga, predložena koncentracija sigurno će obezbediti inhibiciju denaturacije proteina i stabilizaciju membrane eritrocita veću od 50%. S druge strane, hidrolizat u prahu dobijen fermentacijom surutke treba dodati u koncentraciji od najmanje 811,5 mg mL⁻¹ da bi se postigle sve testirane bioaktivnosti sa naglaskom na znatno izraženiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na sve testirane sojeve. Stoga se može zaključiti da enzimaska hidroliza predstavlja optimalan proces za proizvodnju hidrolizata u prahu sa izraženim bioaktivnim svojstvima, koji se kao takvi mogu smatrati veoma perspektivnim dodatkom prirodne hrane. U okviru potpoglavlja *Primena sprej sušenih bioaktivnih hidrolizata proteina surutke* iznet je zaključak: Na osnovu rezultata prikazanih u ovom potpoglavlju, konditorski masni krem odogaćen sa 5% bioaktivnog hidrolizata u prahu ispoljava za 32% jaču antioksidativnu aktivnost, koja odgovara IC₅₀ od 116,52 mg mL⁻¹, od kontrolnog uzorka (171,37 mg mL⁻¹). Ovaj krem ispoljava 2,6 puta veću tvrdoću od kontrolnog uzorka, što je veoma važno ako se krem koristi za punjenje keksa koji zahtijeva znatno čvršće kremove. Konditorski masni krem obogaćen 5% bioaktivnog hidrolizata pokazuje najvišu viskoznost po Casson-u (6,066 Pa•s), površinu tiksotropne petlje (2,455 Pa•s⁻¹) i tvrdoću (1980,7 g), što svakako nije prednost, ali može se izbeći boljom selekcijom emulgatora. Ovaj krem se može smatrati optimalnim, sa stanovišta raspodele veličine čestica i

senzornih karakteristika. Pored toga, može se zaključiti da dodavanje 5% bioaktivnog hidrolizata može zaštititi i sačuvati masni krem tokom četiri meseca skladištenja. Nakon 120 dana skladištenja, antioksidativna aktivnost krema odgovara IC_{50} od $137,42 \text{ mg mL}^{-1}$, što ukazuje na to da bioaktivni hidrolizat i dalje postiže svoju antioksidativnu aktivnost i sposoban je da zaštiti masni krem od potencijalnih slobodnih radikala koji se mogu formirati tokom procesa skladištenja.

U poglavlju **Zaključak**, sumirani su najznačajniji rezultati i saznanja proistekli iz ove doktorske disertacije, sa akcentom na moguću primenu proizvedenih hidrolizata kao dodataka u konditorskim proizvodima.

U poglavlju **Literatura** navedene su sve reference citirane u doktorskoj disertaciji.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Predmet istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije odnosi se na primenu različitih biotehnoloških procesa u proizvodnji hidrolizata proteina surutke širokog spektra bioaktivnosti koji kao takvi mogu naći primenu u različitim prehrambenim proizvodima. Originalni doprinos ove doktorske disertacije jeste optimizacija procesa proizvodnje biotehnološki modifikovanih proteina surutke visoke antioksidativne aktivnosti, unapređenih tehnoloških i funkcionalnih svojstava, kao i ispitivanje mogućnosti njihove primena u prehrambenoj industriji.

Surutka koja nastaje u procesima proizvodnje sira i kazeina predstavlja glavni sporedni proizvod industrije mleka koji spada u jedan od najslabije iskorišćenih sporednih proizvoda prehrambene industrije u Srbiji. Savremeni tempo i način života, kao i sve zagađenije životno okruženje nameću potrebu proizvodnje unapređenih prehrambenih proizvoda koji bi pomogli ljudskom organizmu u borbi protiv štetnih agenasa kojima je svakodnevno izložen. Povećani zahtevi potrošača za zdravijim, prirodnijim i ukusnijim prehrambenim proizvodima iziskuju neodložan razvoj prehrambene industrije u cilju proizvodnje novih funkcionalnih dodataka hrani. Primenom funkcionalnih dodataka ostvarilo bi se povećanje nutritivne vrednosti, senzornog kvaliteta i tehnoloških svojstava prehrambenih proizvoda. Proteini surutke predstavljaju često korišćen suplement u proizvodnji široke palete prehrambenih proizvoda. U nutritivnom smislu proteini surutke predstavljaju izvor esencijalnih aminokiselina neophodnih za rast i razvoj. Enzimskim ili mikrobioloskim tretmanom proteina surutke može se ostvariti njihova modifikacija i proizvesti peptidi koji u funkcionalnom i tehnološkom smislu mogu u značajnoj meri unaprediti svojstva prehrambenih proizvoda.

Zbog unutrašnjih fizičkih i hemijskih karakteristika, kao što su sekvenca, veličina, struktura, njihova međusobna interakcija i interakcija sa drugim molekulima, peptidi su sposobni da formiraju sopstvenu strukturu ili agregate, čime mogu da razviju nova funkcionalna svojstva. Dakle, peptidi u hrani značajno doprinose finalnoj teksturi proizvoda, organoleptičkim svojstvima i ispoljavaju specifične bioaktivnosti kojima se može poboljšati zdravlje potrošača. Peptidi mogu povećati emulgujuća svojstva i svojstva stvaranja pene, poboljšati rastvorljivost, stabilizovati proizvod, smanjiti alergenost i ispoljiti specifične bioaktivnosti.

Sa stanovišta funkcionalnosti, proteinske frakcije surutke sadrže veoma vredne sekvence koje mogu imati određenu biološku aktivnost u ljudskom organizmu. Međutim, ove biološki aktivne sekvence proteina surutke su potpuno inaktivne sve dok se nalaze u okviru matičnih proteina. Stoga, cilj ove disertacije jeste razvoj postupka za proizvodnju bioaktivnih peptida surutke putem sekvencioniranja matičnih proteina surutke primenom komercijalnih enzima. Dobijeni proizvod bi, pored evidentne nutritivne vrednosti, dobio i određenu funkcionalnu vrednost koja bi se ogledala u prisustvu značajne količine biološki aktivnih komponenti.

Postojanje biološki aktivnih peptida je evidentno, međutim potrebno je odgovoriti na mnoga naučna-tehnološka pitanja pre nego što ove vredne supstance mogu biti optimalno eksploatisane u proizvodnji funkcionalne hrane. Danas u svetu postoji sve veći komercijalni interes za proizvodnju

biološki aktivnih peptida iz različitih izvora proteina. Sa druge strane, zbog nedostatka pogodnih tehnologija, proizvodnja bioaktivnih peptida ili proizvoda koji sadrže bioaktivne peptide u Srbiji praktično ne postoji, i većina proteinskih preparata dostupnih na tržištu se uvozi iz drugih zemalja. U tom smislu razvoj procesa proizvodnje bioaktivnih peptida surutke i povećanje isplativosti ovog procesa, može doprineti uvođenju ove tehnologije u postojeće pogone prehrambene industrije što istovremeno u značajnoj meri rešava problem odlaganja surutke i doprinosi zaštiti životne sredine.

Preradom surutke u bioaktivni hidrolizat u prahu u okviru samo jednog procesa iskorišćavaju se svi potencijali surutke kao sirovine a iz životne sredine se uklanja materijal koji predstavlja biološki opasan zagađivač a sa druge strane dobija se potpuno prirodan proizvod unapređenih svojstava. Ovakav način prerade surutke podrazumeva proces nakon koga ne zaostaje ni najmanja količina otpada i predstavlja alternativu procesima prerade surutke u proizvode kao što su mlečna kiselina, etanol, mikrobni proteini, β -D-galaktozidaza i vitamini koji nose sa sobom velike zahteve u pogledu energije i tehnološke opreme. Ovim postupkom prerade surutke ostvaruje se velika ušteda energije u odnosu na komplikovanije procese prerade surutke koji zahtevaju prečišćavanje finalnog proizvoda što dovodi do generisanja nove količine otpada koji je neophodno dalje obrađivati.

Kao potvrdu savremenosti i originalnosti ovaj inovativni postupak proizvodnje za rezultat ima bioaktivni hidrolizat proteina surutke u prahu, unapređenih nutritivnih i funkcionalnih karakteristika dobijen uz ostvarenje koncepta uštede energije i zaštite životne sredine.

Rezultati ove doktorske disertacije pružaju i smernice za buduća istraživanja u okviru biotehnoške oblasti. Na osnovu opsežnog pregleda literature, može se zaključiti da se istraživanja u okviru ove doktorske disertacije uklapaju u svetske trendove i ukazuju na značaj i aktuelnost proučavane problematike.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U doktorskoj disertaciji je dat 161 literaturni navod, od čega je najveći deo objavljen u poslednjih 5-10 godina. Ovo potvrđuje aktuelnost izučavane problematike u svetu. Savremena istraživanja objavljena u navedenim naučnim radovima su opisana, analizirana i diskutovana i izvedeni su zaključci koji su omogućili dobar uvid u oblast proizvodnje unapređenih proizvoda na bazi surutke. Na osnovu pažljive analize rezultata prikazanih u naučnoj literaturi izložene su osnovne smernice za istraživanja koja su izvršena u ovoj doktorskoj disertaciji. Iz spiska korišćene literature i radova koje je kandidat objavio kao deo istraživanja ove doktorske disertacije, uočava se izuzetno veliko poznavanje predmetne oblasti istraživanja, kao i poznavanje aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

Svi rezultati u okviru ove disertacije su dokazani odgovarajućim eksperimentima, kao i savremenim analitičkim instrumentalnim merenjima prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature. Tokom selekcije mikroorganizama i enzima, optimizacije biotehnoških procesa i karakterizacije finalnog proizvoda vršeno je određivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH), redukcione snage (FRAP), emulgujućih svojstava, svojstava penjenja, digestibilnosti, bioraspoloživosti, stepena hidrolize, sadržaja proteina i aminokiselina, sposobnosti stabilizacije membrane eritrocita, sposobnosti inhibicije denaturacije proteina, sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije, antimikrobne aktivnosti, kao i stabilnosti, nutritivnih karakteristika finalnog proizvoda u kome su proizvedeni hidrolizati primenjeni. Tokom procesa selekcije optimalnog bakterijskog soja pogodnog za proizvodnju bioaktivnog hidrolizata visoke antioksidativne aktivnosti ispitana su tri bakterijska soja *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus* i *Lb. reuteri* koji prema navodima u literaturi predstavljaju sojeve izuzetnog proteolitičkog potencijala. Tokom procesa selekcije optimalnog enzimskog preparata pogodnog za proizvodnju bioaktivnog hidrolizata ispitani su enzimi pepsin i tripsin kao proteaze koje su u literaturi označene kao visokoeffikasni enzimi koji

moгу biti primenjivani u procesu razgradnje proteina surutke. Antioksidativni potencijal proizvedenih hidrolizata proteina surutke određivan je kao ukupni potencijal dobijen analizom pojedinačnih potencijala koji su određivani primenom razliĉitih rastvaraĉa (metanol, aceton, heksan) i DPPH radikala, u cilju preciznog određivanja antioksidativne aktivnosti razliĉito naelektrisanih peptidnih frakcija. Osim na ovaj naĉin, antioksidativna aktivnost je određena i primenom FRAP metode. Stepem hidrolize tokom procesa modifikacije proteina određivan je standardnom pH-stat metodom, praćenjem promene pH vrednosti tretiranog uzorka u jedinici vremena. Sadržaj proteina i aminokiselina određivan je metodama po Bredfordu i ninhidrinskom metodom, u skladu sa svojstvima ispitivanog uzorka. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije je određivan na modelu oleinske kiseline. Kao deo anti-inflamatornog i antireumatskog potencijala ispitana je sposobnost stabilizacije membrane eritrocita kao i sposobnost inhibicije denaturacije proteina. Proizvedeni uzorci su takođe testirani po pitanju antimikrobnog potencijala tj. sposobnosti inhibicije rasta patogenih sojeva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (ATCC 25922). Stabilnost proizvedenih hidrolizata kao i konditorskog masnog krema određivana je praćenjem antioksidativnog potencijala tokom 6 meseci skladištenja. Proizvedeni hidrolizat koji je odabran na osnovu visokog bioaktivnog potencijala je plasiran u konditorski masni krem koji zatim nutritivno okarakterisan i koji kao takav mođe biti primenjen u konditorskoj industriji.

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Direktna korist implementacije rezultata proizašlih iz istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije ogleđa se u mogućnosti prerađivaĉa mleka da surutku nastalu u svojim procesima plasiraju i na taj naĉin povrate deo sredstava uloženih u proizvodnju i preradu mleka u svojoj fabrici. Sa druge strane, u ishranu ljudi ukljuĉuje se visoko vredna sirovina koja ima direktan pozitivan uticaj na ljudski organizam. U nauĉnom smislu, doprinos disertacije ogleđa se u kompletnoj karakterizaciji procesa proizvodnje bioaktivnih peptida surutke kao i karakterizaciji bioaktivnog hidrolizata proteina surutke proizvedenog u definisanom procesu. Na osnovu karakteristika proizvedenog hidrolizata predložen je optimalni naĉin njegove primene u konditorskom masnom kremu koji se dalje mođe koristiti kao punjenje za ostale konditorske proizvode, što u znaĉajnoj meri olakšava implementaciju proizvedenog hidrolizata u postojeće recepture konditorskih proizvoda.

Na osnovu rezultata ostvarenih u ovoj disertaciji izvršena je selekcija bakterijskog soja i enzima koji su sposobni da svojim delovanjem omoguće proizvodnju bioaktivnih peptida visoke antioksidativne aktivnosti. Ispitan optimalni naĉin primene bakterijskog soja i enzima koji je u potpunosti optimizovan i dizajniran tako da se njegovom primenom zadovoljavaju svi kriterijumi kvaliteta dobijenog proizvoda. Nakon definisanja postupka i proizvodnje osušeni proizvod je u potpunosti okarakterisan u smislu bioloških i funkcionalnih karakteristika, da bi kao takav mogao naći primenu u određenim proizvodima prehrambene industrije. Predloženo nekoliko naĉina primene dobijenog proizvoda.

Integracija procesa proizvodnje bioaktivnog hidrolizata proteina surutke u postojeće pogone mleĉne industrije ne zahteva velika ulaganja a obzirom da bi surutka svakako bila baĉena, zakljuĉuje se da ovakav vid njenog iskorišćavanja predstavlja direktnu korist kako u materijalnom tako i u funkcionalnom smislu. Verifikacija ostvarenih rezultata disertacije postignuta je objavljivanjem radova u vodećim međunarodnim i domaćim ĉasopisima iz domena ove problematike, i saopštenjima na međunarodnim konferencijama.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni nauĉni rad

U svom dosadašnjem istraživaĉkom radu, kandidat Salem Mohamed Embiriekah, master inž., pokazao je samostalnost i stručnost u pretraživanju literature, pripremi i realizaciji eksperimenata, korišćenju razliĉitih tehnika karakterizacije i analizi i obradi rezultata. Na osnovu

dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalan naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

U prilog prikazu ostvarenih naučnih doprinosa važno je naglasiti da soj *Lactobacillus rhamnosus* nije do sada primenjivan u procesu proizvodnje bioaktivnog hidrolizata proteina surutke, tako da rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalna nova saznanja. Osim toga, proizvedeni bioaktivni hidrolizati su po prvi put primenjivani u konditorskom masnom kremu kao punjenju mnogih konditorskih proizvoda. Poseban naučni doprinos rezultata doktorske disertacije ogleda se u:

- Rešavanju problema odlaganja otpadne surutke njenim prevođenjem u funkcionalni proizvod namenjen ljudskoj ishrani koji bi u potpunosti zadovoljio kriterijume domaćih potrošača.
- Definisaniu optimalnog bakterijskog soja kao i optimalnih uslova za izvođenje procesa fermentacije surutke uz zadovoljenje kriterijuma ekonomičnosti procesa i funkcionalnosti proizvedenog bioaktivnog hidrolizata proteina surutke.
- Definisaniu optimalnog enzima kao i optimalnih uslova za izvođenje procesa enzimske hidrolize surutke uz zadovoljenje kriterijuma ekonomičnosti procesa i funkcionalnosti proizvedenog bioaktivnog hidrolizata proteina surutke.
- Karakterizaciji proizvedenih hidrolizata u nutritivnom i funkcionalnom smislu.
- Definisaniu uslova procesa sprej-sušenja bioaktivnog hidrolizata proteina surutke visoke antioksidativne aktivnosti kao i karakterizacija dobijenog proizvoda u prahu.
- Definisaniu optimalnog načina primene proizvedenog bioaktivnog hidrolizata proteina surutke, kao i ispitivanju svojstava novog funkcionalno unapređenog prehrambenog proizvoda obogaćenog bioaktivnim hidrolizatom proteina surutke, koji dalje može biti primenjivan u različitim konditorskim proizvodima.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Definisanje optimalnog bakterijskog soja i enzima za izvođenje procesa fermentacije i enzimske hidrolize proteina surutke u cilju proizvodnje biaktivnog hidrolizata proteina surutke je izvedeno na osnovu analize sposobnosti testiranih sojeva i enzima da proizvode peptide visoke antioksidativne aktivnosti. Osim antioksidativne aktivnosti, kao veoma značajan kriterijum pri selekciji praćena su funkcionalna svojstva proizvedenih hidrolizata, obzirom da je cilj proizvodnje bioaktivnih hidrolizata bio njihovo dalje plasiranje u konditorski masni krem. Nakon sveobuhvatne analize, selektovani su bakterijski soj i enzim koji na optimalan način zadovoljavaju navedene kriterijume i doprinose kvalitetu finalnog proizvoda, pri čemu su ostvareni rezultati bili značajno bolji od mnogih literaturno objavljenih rezultata. Kao optimalan bakterijski soj izabran je soj *Lb. rhamnosus* dok se kao optimalan enzim pokazao tripsin pri E/S odnosu od 0.5%. Poređenjem ova dva procesa proizvodnje biaktivnih hidrolizata proteina surutke došlo se do zaključka da se procesom enzimske hidrolize proizvodi hidrolizat značajno većeg bioaktivnog potencijala i unapređenih funkcionalnih karakteristika. Osim toga, sam proces enzimske hidrolize traje tri puta kraće od procesa fermentacije surutke, što u značajnoj meri umanjuje troškove proizvodnje. Sa druge strane, procesom enzimske hidrolize proizvodi se hidrolizat značajno boljih funkcionalnih svojstava što je takođe potvrđeno njegovom primenom u konditorskom masnom kremu. Konditorski masni krem obogaćen sa 5% bioaktivnog hidrolizata proizvedenog enzimskom hidrolizom proteina surutke pomoću tripsina, ispoljio je značajno bolji kvalitet u odnosu na krem obogaćen hidrolizatom proizvedenim primenom procesa fermentacije surutke. Osim antioksidativnog potencijala ovaj hidrolizat ispoljava i visoku digestibilnost, biorazgradivost,

sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije i denaturacije proteina, sposobnost stabilizacije membrane eritrocita. Takođe, u skladu sa visokim bioaktivnim potencijalom hidrolizat proizveden enzimskom hidrolizom proteina surutke pomoću tripsina, značajno doprinosi stabilnosti konditorskog masnog krema tokom procesa skladištenja. Primenom postupka proizvodnje hidrolizata enzimskom hidrolizom proteina surutke pomoću tripsina, otpadna surutka može na uspešan način biti prevedena u unapređeni funkcionalni proizvod namenjen ljudskoj ishrani koji u potpunosti zadovoljava kriterijume domaćih potrošača, čime se iz životne sredine uklanja otpadna surutka koja predstavlja veoma veliki zagađivač. U okviru ove doktorske disertacije u proizvodnji bioaktivnog hidrolizata proteina surutke prvi put je primenjen soj *Lactobacillus rhamnosus* tako da rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalna nova saznanja. Osim toga, proizvedeni bioaktivni hidrolizati su po prvi put primenjivani u konditorskom masnom kremu kao punjenju mnogih konditorskih proizvoda.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Salem Mohamed Embiriekah, master inž. je svoje rezultate potvrdio objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog značaja kao i saopštavanjem radova na međunarodnim skupovima. U okviru izrade ove doktorske disertacije kandidat je prvi autor jednog rada u istraiknutom međunarodnom časopisu (M22), jednog rada u časopisu međunarodnog značaja (M23), jednog rada saopštenog na skupu međunarodnog značaja (M33), 1 poglavlja u knjizi vodećeg međunarodnog značaja (M13) i koautor 2 poglavlja u knjizi vodećeg međunarodnog značaja (M13).

Poglavlja u knjizi vodećeg međunarodnog značaja (M13)

1. Bulatović, M., **Embiriekah, S.**, Zarić, D., Vukašinović-Sekulić, M., Rakin M.: Functional Properties of Dairy Protein Hydrolysates, In *Protein Hydrolysates: Uses, Properties and Health Effects*, Nova Science Publishers, New York, pp. in press, 2018 (ISBN: in press).
2. **Embiriekah, S.**, Bulatović, M., Zarić, D., Borić, M., Rakin M.: Bioactive Potential of Whey Protein Hydrolysates, In *Protein Hydrolysates: Uses, Properties and Health Effects*, Nova Science Publishers, New York, pp. in press, 2018 (ISBN: in press).
3. Zarić, D., **Embiriekah, S.**, Lončarević, I., Pajin, B., Bulatović, M., Rakin M.: Application of Whey Protein Hydrolysates in Confectionery Fat Filling, In *Protein Hydrolysates: Uses, Properties and Health Effects*, Nova Science Publishers, New York, pp. in press, 2018 (ISBN: in press).

Radovi objavljeni u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. **Embiriekah, S.**, Bulatović, M., Borić, M., Zarić, D., Rakin M.: Antioxidant activity, functional properties and bioaccessibility of whey protein hydrolysates, *International Journal of Dairy Technology*, vol. 71, no. 1, pp. 243-252, 2017 (**IF=1.225**) (ISSN 1364-727).

Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu (M23)

1. **Embiriekah, S.**, Bulatović, M., Gnjatović, M., Vukašinović-Sekulić, M., Krunic, T., Zarić, D., Rakin, M.: Comparative analysis of functionality of spray dried whey protein hydrolysates obtained by enzymatic and microbial hydrolysis, *Chemical Industry*, Accepted, 2018 (**IF=0.591**) (ISSN 0367-598).

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)

1. **Embiriekah, S.**, Bulatović, M., Borić, M., Zarić, D., Arsić, S., Rakin, M: Selection of *Lactobacillus* strains for improvement of antioxidant activity of different soy, whey and milk protein substrates, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, Vol 16, pp. 64-69, 2016, Ohrid, Macedonia, (ISSN 1857-8489)

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu svega napred iznetog, Komisija smatra da doktorska disertacija kandidata Salem Mohamed Embiriekah, master inž., pod nazivom „Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim putem“ („Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“) predstavlja značajan i originalni naučni doprinos u oblasti Tehnološko inženjerstvo, što je potvrđeno radovima objavljenim u časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja. Predmet i ciljevi istraživanja su jasno navedeni i ostvareni. Komisija, takođe, smatra da doktorska disertacija pod nazivom „Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim putem“ („Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“) u potpunosti ispunjava sve zahtevane kriterijume. Kandidat je ispoljio naučno-istraživačku sposobnost i samostalnost u svim fazama izrade ove disertacije. Imajući u vidu obim i kvalitet dobijenih rezultata, mogućnost njihove primene u praksi, kao i sposobnosti koje je kandidat pokazao Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću TMF-a da prihvati ovaj Referat i da se doktorska disertacija pod nazivom „Funkcionalna svojstva i primena hidrolizata proteina surutke dobijenih biotehnoškim putem“ („Functional properties and possibility of application of whey protein hydrolysates obtained by biotechnological processing“) kandidata Salem Mohamed Embiriekah, master inž., prihvati, izloži na uvid javnosti u zakonski predviđenom roku i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu, kao i da nakon završetka procedure, pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

ČLANOVI KOMISIJE

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

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

.....
Dr Maja Bulatović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Dr Danica Zarić, viši naučni saradnik
IHIS Tehnoexperts, Istraživačko-razvojni centar, Beograd