

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Иване В. Газикаловић**, мастер инжењера технологије

Одлуком Наставно-научног већа **бр. 35/44** од **14.03.2024.** године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Иване В. Газикаловић** под насловом

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

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

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

Школске **2016/2017.** године кандидат Ивана В. Газикаловић, мастер инж. технологије, уписала је докторске студије, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду.

04.02.2021. – На седници Наставно-научног већа донета је **одлука бр. 35/20** о именовању Комисије за оцену подобности теме под називом „Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава“, и подобности кандидата Иване В. Газикаловић, мастер инж. технологије, за израду докторске дисертације.

11.03.2021. – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду донета је **одлука бр. 35/57** о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме под називом: „Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава“ и кандидата за израду докторске дисертације Иване В. Газикаловић, мастер инж. технологије, а за ментора ове докторске дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду.

28.04.2021. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду донета је одлука (**одлука бр. 61206-1773/2-21**) о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације Иване В. Газикаловић, мастер инж. технологије, под називом: „Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава“.

На захтев Иване В. Газикаловић, студента докторских студија, а уз сагласност ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић, Декан Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду је донео решење о продужењу рока за завршетак студија **28.11.2022. Решење бр. 20/187** којим је одобрен продужетак рока за завршетак студија у до истека троструког броја школских година потребних за реализацију уписаног студијског програма, до краја школске 2025/2026.

14.03.2024. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета у Универзитета у Београду донета је **одлука бр. 35/44** о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Иване В. Газикаловић, мастер инж. технологије под називом: „Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава“.

1.2. Научна област дисертације

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

1.3. Биографски подаци о кандидату

Ивана (Владан) Газикаловић, мастер инжењер технологије, рођена је 21.06.1992. године у Београду, где је завршила основну школу и Прву београдску гимназију. 2011/12. године уписала је основне студије на Технолошко-металуршком факултету, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Дипломирала је 2015. године одбраном завршног рада на тему „Утицај различитих предтретмана на функционална и сензорна својства хидролизата протеина беланаца” и потом уписала мастер студије у академској 2015/16. години, такође на смеру Биохемијско инжењерство и Студијски програм Биотехнологија. Мастер студије завршила је одбраном мастер рада на тему „Утицај услова ферментације на производњу мананазе из *Bacillus* sp.“ 2016. године. Школске 2016/17. уписала је докторске студије на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под менторством проф. др Зорице Кнежевић-Југовић. Све испите предвиђене планом и програмом докторских студија, укључујући и Завршни испит, положила је оценом 10 (десет). Добитница је награде „Панта С. Тутунџић“ за одличан успех на основним студијама. Такође, била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја у периоду од 2017-2018. године. Од јуна 2018. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач приправник (датум избора у звање: 31.05.2018.) на пројекту „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИИИ 46010). Од 29.06.2021. године изабрана је у истраживачко звање истраживач сарадник. Учесник је пројеката ИИИ 46010, Еурека Е!13082 BIOFLOSBAKE – LAVGLU (Novel bioprocessing tools for production of improved bakery products with detoxified gluten and fortified with dietary fibres), COST – PHOENIX, AmnioPrintCare PROMIS 2023. Током студија била је ангажована на вежбама из предмета Биотехнолошки практикум 1 (шк. 2018/19) и Биотехнолошки практикум 2 (шк. 2019/20 и 2020/21). Говори енглески, француски и шведски.

У периоду од 2018. године до данас непосредно је учествовала у изради, организовању и извођењу укупно 15 завршних и мастер радова студената студијског програма Биохемијско инжењерство и биотехнологија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У свом досадашњем раду објавила је као аутор или коаутор једног рада у врхунском међународном часопису (M21), три рада у истакнутом међународном часопису (M22), једног рада у међународном часопису (M23), десет саопштења на међународним скуповима (M30) - од којих три саопштења штампана у целини (M33) и седам саопштења штампана у изводу (M34), три рада у врхунском часопису националног значаја (M51), два саопштења са скупа националног значаја штампано у целини (M63), четири саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу (M64), једно ново техничко решење примењено на међународном нивоу (M81), један пријављени домаћи патент (M87) и једну ауторску изложбу са каталогом уз научну рецензију (M99). Сви публиковани радови су произашли као резултат ангажовања докторанда у оквиру пројекта финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ИИИ 46010) и Еурека Е!13082 BIOFLOSBACE – LAVGLU. Током докторских студија учествовала је на сајмовима и научним скуповима, при чему је најистакнутији 65. Међународни сајам технике и техничких достигнућа: Играј за човечанство! Наука за све. Била је део научног тима током извођења експеримената потребних за реализацију три Иновациона ваучера.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Иване В. Газикаловић написана је на 150 страна, са укупно 13 поглавља, укупно 56 слика (52 у тексту, 4 у прилогу), 36 табела и 239 литературних навода. Докторска дисертација садржи поглавља: Увод, Теоријски део (6 поглавља), Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак, Литература, Списак слика, Списак Табела. На почетку дисертације налазе се изводи на српском и енглеском језику, захвалнице, садржај, док се на крају дисертације налазе Прилози, Доказ о плаћеној накнади за коришћење услуге BioRender, Биографија кандидата и три обавезна Прилога: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије рада и Изјава о коришћењу, а на самом крају Оцена извештаја о провери оригиналности урађене докторске дисертације.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У првом поглављу, **1. Увод**, описан је проблем тренутне производње производа без глутена или са смањеним садржајем глутена, објашњена је важност примене глутена у прехранбеној индустрији и његов утицај на вискоеластична својства. Даље, изложен је проблем гастроинтестиналних поремећаја који се јављају код људи који имају неки облик алергијске реакције на глутен, на који начин се тај проблем тренутно превазилази и која су нека предвиђања за будућност. Описани су експериментални приступи и циљеви ове дисертације, дат је теоријски преглед постојећег проблема производње безглутенских производа, примене ензимских технологија и различитих нетермичких технологија као основних третмана глутена и глутенског брашна, али и као претретмана у циљу унапређења ензимског процеса.

Након увода следи **теоријски део**, који се као засебна целина састоји од **6 поглавља** даље подељених у одговарајући број потпоглавља/целина. У поглављу **2. Ензимски препарати – основне карактеристике и примена**, тачније, 2.1. Протеазе, 2.1.1. Примена ензима за смањење алергености глутена, дат је преглед примене протеолитичких ензима који се користе за смањење алергености глутена. Ово поглавље се састоји из четири целине (2.1.1.1-4.), у првој су описани бактеријски ензими попут пролил-ендопептидазе, у другој протеазе

добијене бактеријама млечно-киселинског врења, у трећој протеолитички ензими пореклом из плесни и у четвртој целини описане су тренутно познате бактерије рода *Bacillus* за које је установљено да су продуценти ензима који се могу користити за разградњу глутена.

У поглављу **3. Пшеница као извор глутена – житарице које садрже глутен**, потпоглавље 3.1. Структура и састав пшеничног зрна детаљно је обрађена (у 3 целине) тема класификације протеина пореклом из пшенице, структура глутена као и његова основна физичко-хемијска својства.

У поглављу **4. Имуни одговор, целијачна и остале болести изазване уносом глутена**, у два потпоглавља је обрађен механизам настанка имуног одговора и дефинисани су токсични пептиди глутена (4.1.). Описани су и ЕЛИСА имунотестови који се користе за одређивање садржаја глијадина као основног алергена глутена (4.2.).

У поглављу **5. Претретмани глутена и њихове главне карактеристике** дат је свеобухватни преглед тренутно постојећих метода описаних у литератури за третман глутена у циљу смањења његове алергености. У потпоглављу 5.1. Микроталасно зрачење детаљно је анализирана постојећа литература и досадашња достигнућа у примени микроталасног зрачења у циљу смањења алергених епитопа глутена и ефекта који има на техно-функционална својства протеина.

У поглављу **6. Моделовање процеса и метода одзивних површина – Vox-Behneken модел**, у потпоглављу 6.1. Vox-Behneken дизајн извршен је теоријски преглед примене методе одзивних површина за оптимизацију процесних параметара, а дате су и једначине модела.

У поглављу **7. Миксолаб анализа**, потпоглављу 7.1. Испитивање реолошких особина теста помоћу миксолаба дат је преглед литературе, теоријске основе неопходне за тумачење резултата добијених помоћу Mixolab[®]-а, основни протокол уређаја помоћу ког се испитују реолошке особине теста које у себи садржи глутен.

Поглавље **8. Експериментални део**, састоји се од два потпоглавља и то: 8.1. Материјали и инструменти и 8.2. Експерименталне методе. У потпоглављу 8.1. пописани су сви ензими, хемикалије и инструменти коришћени у експерименталном раду. У потпоглављу 8.2. детаљно су описане све примењене експерименталне методе са одговарајућим референцама. У овом поглављу описано је следеће: селекција и скрининг микроорганизама који продукују ензиме са потенцијалним дејством на епитопе глутена, производња ензима помоћу одабраног микроорганизма субмерзном ферментацијом, одређивање протеолитичке активности добијеног ензимског препарата као и активности специфичних протеаза. Дате су методе за одређивање садржаја протеина по Кјелдалу и Лоријева метода. Дат је протокол третмана узорака у микроталасном реактору под контролисаним условима као и конвенционалног топлотног третмана и ензимске хидролизе у шаржном ензимском реактору. Представљени су кинетички модели који су коришћени за описивање ензимске реакције и одређивање кинетичких параметара реакције хидролизе протеина. Дате су методе квантификације реактивних епитопа глутена, одређивања емулгујућих својстава, капацитета и стабилности пене. Антиоксидативна активност узорака одређена је помоћу 1) ABTS радикалног катјона, 2) хелирањем јона метала и 3) неутрализацијом DPPH радикала. Дата је метода квантификације укупних и реактивних сулфхидрилних група у молекулу глутена, инфрацрвене спектроскопије - FTIR, SDS-PAGE електрофорезе као и одређивања површинског напона и зета потенцијала. Профил хидролизата одређен је применом реверснофазне течне хроматографије (RP-HPLC анализа), док су реолошка својства нативног и модификованог глутена одређена Mixolab[®] анализом. Дате су и методе за одређивање антимикробне активности хидролизата, фракционисања хидролизата, оптимизације поступка хидролизе пшеничног брашна као и статистичка обрада експерименталних података.

Поглавље **9. Резултати и дискусија** састоји се од девет потпоглавља, даље подељених у одговарајући број целина у складу са обрадом и анализом постигнутих резултата. У

потпоглављу 9.1. изложени су постигнути експериментални резултати који се односе на одабир производног микроорганизма за микробиолошку ферментацију у циљу производње протеолитичког ензима који има могућност да хидролизује глутен. Обрађени су резултати који се односе на утицај састава хранљиве подлоге на производњу ензима као и утицај рН вредности на производњу и активност добијене протеазе. У потпоглављу 9.2. приказани су резултати прелиминарних истраживања на модел протеину глутену. Анализом података добијених у овој фази експерименталног рада успешно је изведен закључак о количини неопходног супстрата и ензим-супстрат односа неопходних за успешну хидролизу глутена. У потпоглављу 9.3. Микроталасни и топлотни третман, извршена је детаљна анализа добијених експерименталних података који се тичу утицаја ова два третмана на конформацију и садржај алергених епитопа глутена. У овом потпоглављу дата је анализа утицаја топлотног и микроталасног третмана на нативни глутен, при чему су обрађени подаци који се односе на утицај одабране снаге микроталаса (200-800W) и температуре. Утицај микроталасног и топлотног третмана на алергене епитопе глутена изражен је преко релативног садржаја глутена након одабраних третмана. Додатна објашњења су дата кроз анализу укупних и реактивних сулфхидрилних група у третираним узорцима. Изведени закључци упоређени су са тренутно доступном научном литературом, и дато је објашњење тренутног проблема контроле процеса и недостатка процесних података описаних у литератури. У потпоглављу 9.4. Ензимска хидролиза и њен утицај на смањење садржаја алергена глутена описане су три целине. Прва се тиче утицаја микроталасног третмана као претретмана за ензимску хидролизу. Овде је настављено истраживање примене микроталасног третмана као претретмана за хидролизу комерцијалним ензимом Алкалазом у циљу добијања хидролизата смањених алергених вредности. Испитана је серија ензимских хидролиза са микроталасним претретманима различитих снага како би се детаљније описао утицај на ток хидролизе и производњу хидролизата са смањеним садржајем алергених епитопа. Након тога извршен је одабир најефикаснијег микроталасног претретмана (200 W) за поступак ензимске хидролизе у циљу производње хидролизата протеина са смањеним алергеним садржајем и унапређеним функционалним својствима.

У следећој целини дато је објашњење резултата експерименталног рада који се односи на ензимску хидролизу протеина пшеничног брашна, тачније протеина брашна у присуству угљених хидрата применом истог ензима. Експериментална поставка је била таква да су испитане четири различите концентрације супстрата (5–20% (w/w)) при одређеном ензим-супстрат односу. Дато је поређење добијених резултата са доступном научном литературом и постигнути резултати су у складу са резултатима постигнутим са другим ензимским препаратом. Изведен је закључак да је присуство угљених хидрата имало позитиван утицај на ток ензимске хидролизе, чиме су протеини успешно модификовани, а њихова својства очувана или унапређена.

У трећој целини описан је поступак хидролизе модел протеина, нативног глутена, ензимом Проназа. Ова целина се бави експериментално-теоријским делом примене овог ензима с обзиром да се овај ензим користи примарно у дијагностичке сврхе. Изведени закључци указују на то да овај ензим, додат у већим концентрацијама, успешно делује на пептидне везе унутар нативног глутена, чиме успешно смањује алергени потенцијал. У потпоглављу 9.5. Структурне промене, дата је опширнија анализа свих структурних промена хидролизата глутена (Алкалазом и Проназом) и протеина пшеничног брашна (Алкалазом) методама описаним у експерименталном делу. У складу са тим, за сваки од добијених хидролизата испитане су промене секундарне структуре протеина. Методом деконволуције добијених спектра помоћу FTIR анализе детаљније су описани елементи секундарне структуре анализираних протеина (α -хеликс, β -плоче, језгра). Применом SDS-PAGE електрофорезе испитани су електорофоретски профили свих хидролизата, са циљем да се установи да ли је дошло до денатурације или агрегације молекула протеина. Резултати ових анализа директно су доведени у везу са измереним релативним садржајем алергених епитопа глутена.

Мерењем агрегационих карактеристика хидролизата глутена и протеина пшеничног брашна извршено је поређење расподеле величине добијених честица (d , nm) као и њиховог наелектрисања (mV). На основу ових података изведени су закључци о потенцијалној примени ових хидролизата за формирање стабилних раствора који не подлежу агрегацији. У целини која се бави RP-HPLC анализом добијених узорака, потврђени су резултати и претходно изведени закључци приказани електрофорезом.

У *потпоглављу 9.6.* Антиоксидативна и функционална својства протеинских фракција глутена модификованих ензимским поступцима и микроталасним третманом, детаљно су описана технолошко-функционална и антиоксидативна својства добијених хидролизата. У свим целинама описани су индекси емулгујућих активности (EAI, m^2/g), индекси емулгујуће стабилности (ESI, h), капацитет и стабилност пене (FC, FS, %), антиоксидативне активности (%) према ABTS⁺ и DPPH радикалима, хелирање јона метала (%), као и IC_{50} (mg/ml) вредности ових активности. У *потпоглављу 9.7.* Антимикробна својства хидролизата протеина глутена модификованих ензимским поступцима и микроталасним претретманом, представљени су резултати испитивања могућности добијених хидролизата глутена и протеина брашна да делују антимикробно на стандардне три културе патогена (*E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*). У *потпоглављу 9.8.* Моделовање ензимске хидролизе применом *Borhnen* експерименталног плана, дати су резултати оптимизације процеса ензимске хидролизе пшеничног брашна помоћу методе одзивних површина. Објашњен је утицај улазних процесних параметара (pH, температура, ензим-супстрат однос, количина супстрата) на ток ензимске хидролизе, релативни садржај глутена, као и ABTS⁺ и MICA активности. У *потпоглављу 9.9.* Миксолаб анализа, обрађени су експериментални резултати добијени помоћу Mixolab[®]-а. Применом хидролизата пшеничног брашна 15% (w/w) креирана је замеса са безглутенским брашном и праћено је пет кључних параметара за одређивање особина теста (C1-5), а потом су детаљно анализиране њихове међусобне зависности.

Поглавље **10. Закључак** даје сумарно најважније закључке и резултате који су постигнути током израде ове дисертације. У поглављу **11. Литература** дат је списак литературе по презименима првих аутора, а у поглављима **12. Списак слика** и **13. Списак табела** наведени су називи слика и табела по редоследу појављивања у тексту са нумерацијом стране на којој се налазе.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Пораст популације праћен је све већим захтевима у погледу разноврсности и доступности прехранбених производа одређених квалитета. Технолошко инжењерство је последњих година суочено са проблемом проналажења нових и унапређивањем традиционалних прехранбених производа као и развојем економски одрживих поступака производње у виду утрошка енергије, хемикалија и воде. Житарице представљају основу људске исхране, имају велики значај у агроиндустрији и представљају један од основних извора протеина у исхрани човека. Пшенично брашно је богато протеинима и има примену у разним гранама прехранбене индустрије, док глутен који се састоји од фракција глијадина и глутенина представља главни споредни производ индустрије скроба, што га чини јефтиним и лако доступним супстратом. Глутен је богат есенцијалним аминокиселинама и он обезбеђује нутритивну вредност у том погледу. Такође утиче на реолошка својства теста, у виду еластичности, квалитета печења, јачине протеинске мреже и способности задржавања воде у производима. Глутен се формира додатком воде у протеинску смешу која садржи глутенине глијадине. Конзумација глутена може утицати на здравствено стање индивидуа осетљивих на одређене фракције глутена, чиме је употреба сировог глутена ограничена. Елиминацијом глутена као главног протеина из прехранбених производа снижава се нутритивна вредност и

нарушавају се сензорна својства производа. Овакви производи у себи последично садрже повећану количину додатих масти, угљених хидрата и адитива како би се очувала технолошко-функционална и нутритивна својства производа. Економска оправданост се овим поступком елиминације глутена из производа нарушава, што наводи инжењерску струку да пронађе нове алтернативне и исплативе методе обраде глутена или протеина пшеничног брашна тако да задрже своја нутритивна и функционална својства, док истовремено имају смањен алергени потенцијал. Неки од предложених приступа за модификацију глутена и протеина брашна огледају се у примени микроталасне енергије под контролисаним условима или уз ензимску хидролизу чиме би се произвели биоактивни и функционално унапређени пептиди глутена и протеина брашна. Примена комерцијалног протеолитичког ензима Алкалазе показала се као одличан избор за производњу биоактивних и функционално унапређених пептида. С обзиром да су се досадашње методе микроталасних третмана базирале углавном на обичним кухињским микроталасним пећницама без могућности континуалног мешања током зрачења и контроле температуре и примењене снаге, примена микроталасног реактора у сврхе производње биоактивних пептида унапређених својстава и смањених алергених вредности представља значајан искорак у области истраживања микроталасне модификације глутена. Резултатима који су остварени и публиковани током израде ове дисертације дат је значајан допринос бољем разумевању и тумачењу промена насталих унутар секундарне структуре молекула применом микроталасног зрачења под контролисаним условима. Ензимски поступак хидролизе пшеничног брашна представља други значајан допринос методологији модификације протеина брашна са циљем производње хидролизата смањених алергених својстава и унапређених биоактивних и функционалних својстава. Хидролизом пшеничног брашна могуће је остварити производњу хидролизата протеина у виду биоактивних пептида без потребе за претходним уклањањем скробних материја. Поступком ензимске хидролизе помоћу Алкалазе могуће је прво директно деловати на протеинске фракције доступне у протеинском брашну, без употребе додатних хемиклија за уклањање скробних материја. У овој дисертацији, на основу нашег увида у литературу, први пут је описано дејство ензима Проназе на глутен, његова способност за производњу биоактивних пептида унапређених својстава, чиме је дата основа за нека будућа истраживања на тему модификације глутена и добијања производа са додатном вредношћу.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Приликом израде докторске дисертације кандидат је извршио детаљан преглед и анализу тренутно доступне научне и стручне литературе из области које су у вези са темом докторске дисертације. Цитирањем 239 литературних навода омогућена је детаљна анализа проблема у научној области и представљање добијених резултата експерименталног рада. Цитирана научна и стручна литература се састоји од радова публикованих у врхунским међународним часописима и књигама. Анализом тренутно постојећих проблема и решења дати су основни постулати за истраживања спроведена у овој докторској дисертацији. На основу образложења пријављене теме докторске дисертације, прегледа литературе коришћене током истраживања и објављених радова кандидата евидентно је познавање области истраживања и актуелног стања у овој конкретној области.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Овом дисертацијом обухваћена је производња хидролизата нативног глутена и хидролизата протеина брашна са побољшаним технолошко-функционалним својствима и смањеним садржајем алергених епитопа методама описаним у пријави докторске дисертације. Експерименталне анализе су спроведене коришћењем одговарајућих савремених аналитичких инструменталних метода у оригиналној или модификованој форми из

литературе. Обрадом и анализом и података помоћу доступних софтвера приказани су резултати експерименталног рада. Микроталасни третман вршен је помоћу микроталасног реактора (Anton Paar Monowave 300, Anton Paar GmbH, Аустрија) под контролисаним условима. Експеримент је вршен применом различитих снага микроталаса и при различитим температурама. Ензимска реакција хидролизе нетретираних узорака као и микроталасно претретираних протеина глутена изведена је у поченој фази истраживања у шаржном реактору са пропелерском мешалицом, са аутоматском контролом температуре и рН вредности. Ток и кинетика ензимске хидролизе протеина беланцета праћен је мерењем степена хидролизе (рН-стат методом), а он је пропорционалан количини α -амино група које се ослободе у току реакције и количини утрошене базе за одржавање константне рН вредности. Квантификација реактивних епитопа глутена вршена је помоћу имуно компетитивног ELISA теста (RIDASCREEN® Gliadin Competitive, R-Biopharm, Darmstadt, Немачка). Применом овог теста одређује се садржај глијадина у узорку и на основу тог податка се долази до процене о количини присутног глутена у узорку. Даље, расподела молекулске масе добијених хидролизата протеина нативног глутена и протеина брашна одређена је помоћу SDS-PAGE електрофорезе у јединици за вертикалну електрофорезу (Hofer™ Mighty Small™ II Mini Vertical Electrophoresis System, GE Healthcare Life Sciences, SAD). Ультрафилтрационо раздвајање хидролизата глутена извршено је коришћењем ультрафилтрационе чаше са магнетним мешањем (Millipore Corporation, Bedford, MA, SAD) и одговарајућих мембрана величина пора 30, 10, 3 и 1 kDa. Исто тако примењена је реверзно-фазна хроматографија високох перформанси (RC-HPLC) применом Nucleosil® C-18 колоне. Промене у структури микроталасно третираних узорака, као и хидролизата глутена и пшеничног брашна окарактерисане су мерењем средње величине честица, њихове расподеле и полидесперзног индекса, зета-потенцијала помоћу Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Промене у структури глутена, пре и након микроталасног третмана и ензимске хидролизе, пшеничног брашна пре и након ензимске хидролизе, мерени су помоћу спектрометра Nicolet iS10 (Thermo Scientific™, Inc) у области амида I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$), амида II ($1510-1560\text{ cm}^{-1}$) и амида III ($1200-1300\text{ cm}^{-1}$). Антиоксидативна активност хидролизата и/или фракција пептида је испитана спектрофотометријским мерењем способности хидролизата или фракција пептида да редукују 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал (DPPH•), 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонску киселину) радикалски катјон (ABTS^{•+}), хелирају металне јоне (јоне гвожђа). Антимикробна активност хидролизата испитана је стандардним *in vitro* тестом - методом дифузије на агарној подлози. Антимикробна активност је изражена дефинисањем ширине зоне инхибиције микробиолошким тестовима спроведеним на Грам-позитивном (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), Грам-негативном (*Escherichia coli* ATCC 25922) и на квасцу (*Candida albicans* ATCC 24433). Термо-механичка својства одабраног хељдиног интегралног брашна супституисаног са 1 и 5% НВ 15% (w/w) хидролизата брашна извршена су помоћу Mixolab® (Chopin Technology, Француска) уређаја, применом модификованог Chopin+ протокола. Сва наведена испитивања изведена су према оригиналним или модификованим методама доступним у литератури.

3.4. Применљивост остварених резултата

Прегледом објављених доступних литературних података и резултата објављених у оквиру ове докторске дисертације остварен је допринос у могућности примене микроталасног претретмана за добијање хидролизата глутена са унапређеним својствима и смањеним садржајем алергених епитопа. Такође могуће је применити микроталасни претретман у циљу добијања биолошки активних пептида. Резултати објашњени у оквиру ове дисертације дају научни допринос у погледу деловања микроталасног зрачења и ензимске хидролизе на структурне промене глутена, као што су садржај сулфхидрилних група, секундарне структуре, зета потенцијала, расподеле величине честица, што даје могућност успостављања

законитости у њиховом деловању на глутен и значајно рационалнији приступ у погледу примене резултата. На основу одабира снаге микроталаса могуће је ефикасно утицати на доступне реактивне епитопе глутена. Фракционисањем микроталасно претретираних хидролизата глутена могуће је издвојити пептидне фракције одређене молекулске масе са унапређеним антиоксидативним својствима. Литературни преглед упућује на чињеницу да се истраживања спроводе на модел протеину, нативном глутену, изолованом одређеним хемијским поступцима или применом предефинисане стандардне смеше глутена. У литератури нема много навода да се као супстрат користи сирово пшенично брашно, богато свим протеинима који се налазе у пшеничном брашну, а не само глиадинима и глутелинима. Применом ензимске хидролизе Алкалазом на пшенично брашно добијени су биоактивни пептиди смањених алергених вредности. Ово је један од значајнијих резултата постигнутих истраживањима у оквиру ове дисертације. Протеини у свом нативном облику, као и хидролизати добијени ензимским поступцима са или без претретмана поседују одређена биолошка и технолошко-функционална својства за примену у безглутенским замесима. Креирањем биолошки активних пептида са одређеном дужином ланца могу се произвести посебно дефинисани пептиди за примене у формулацијама производа који захтевају одређена емулгујућа и пенива својства. Смањењем алергеног потенцијала проширена је палета производа у којима се могу применити ови биоактивни пептиди богати аминокиселинама пролином и глутамином. Хидролизати произведени методама примењеним у оквиру ове дисертације се могу разматрати за даљу примену у безглутенским производима (кекс, паста, намази), функционалним производима обогаћеним биоактивним пептидима, али и као потенцијални носачи у области инжењерства ткива. Оптимизацијом процеса производње хидролизата брашна са унапређеним својствима и смањеним алергеним потенцијалом добијени су подаци о оптималним условима и важним параметрима који утичу на сам поступак ензимске хидролизе. Сви добијени хидролизати испољили су повећану антиоксидативну активност у поређењу са нативним глутеном или пшеничним брашном. Овако унапређени биоактивни пептиди се могу успешно додати у формулације за припрему одређених врста кекса, пасте, колача, грисина.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Ивана В. Газикаловић, мастер инжењер технологије, је током израде докторске дисертације показала самосталност у претраживању научне литературе, креирању и реализацији експеримената, као и обради резултата. Приликом извођења експеримената показала је и да влада научним и истраживачким методама, као и да поседује практична знања за самосталан научни рад. На основу досадашњег ангажовања и остварених резултата, Комисија сматра да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научноистраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

На основу резултата добијених у оквиру истраживања током израде докторске дисертације може се закључити да је остварен допринос у области утврђивања механизма деловања микроталасног третмана како на пречишћен глутен (модел протеин), тако и на глутен у реалном систему, односно пшеничном брашну. Тренутно нису доступни литературни подаци о утицају микроталаса на структуру и алергеност глутена у контролисаним условима, при чему се подразумева мешање, контрола температуре, време третмана као и примењена снага. Неки од најзначајнијих научних доприноса су следећи:

- Постигнут је допринос у разумевању механизма деловања микроталаса на структуру глутена и конформацију алергених епитопа. Деловањем микроталаса детектован је смањен садржај реактивних епитопа глутена у свим третираним узорцима, при чему је деловањем микроталаса снаге 200 W задржано $39,65 \pm 1,69\%$ почетног алергеног садржаја.
- Утврђено је да је утицај микроталасног третмана на конформацију алергених епитопа реверзибилан, односно сам микроталасни третман није поуздан за трајно смањење алергености глутена.
- Утврђено је да микроталасни третман глутена унапређује ензимску хидролизу у погледу повећања степена хидролизе, али и антиоксидативне активности добијених хидролизата.
- Утврђена је корелација између степена ензимске хидролизе и антиоксидативне активности хидролизата као и степена хидролизе и функционалних својстава. Унапређен је капацитет и стабилност пене код хидролизата код којих поступак ензимске хидролизе није извршен до краја.
- Утврђено је да комбиновани третман који се заснива на микроталасном претретману и парцијалној ензимској хидролизи протеазом из *Bacillus licheniformis* (Алкалазом) је поуздан третман у смањивању садржаја токсичних секвенци глутена.
- Микроталасни третман праћен ензимском хидролизом резултовао је у протеинском хидролизату глутена са високом негативном вредности зета потенцијала, ($-31,03 \pm 2,18$ mV) који указује на формирање стабилних раствора.
- Микроталасни претретман праћен ензимском хидролизом позитивно делује на производњу пептида мањих молекулских маса (3–10 kDa) са повећаним афинитетом ка хелирању јона Fe^{2+} .
- Примена ензима Алкалазе допринела је производњи хидролизата протеина брашна са унапређеним технолошко-функционалним својствима и смањеним садржајем алергених епитопа.
- Утврђен је механизам ензимске хидролизе на глутен у присуству скроба у реалном систему.
- Ензим, протеаза из *Streptomyces griseus* (Проназа), која је први пут коришћена у хидролизи глутена, показала се као ефикасан биокатализатор у хидролизи глутена и смањењу садржаја алергених епитопа.
- Оптимизоване су вредности процесних параметара током ензимске хидролизе протеина брашна применом методе одзивних површина у погледу добијања хидролизата са смањеном алергеношћу као и унапређеним антиоксидативним и реолошким својствима.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне литературе из области истраживања ензимске модификације и смањења алергеног потенцијала глутена, као и разматрањем резултата добијених у оквиру истраживања ове докторске дисертације, уочава се да постигнути резултати дају значајан допринос постојећим сазнањима. Применом нове методологије третирања глутена помоћу микроталасног реактора у контролисаним условима, оптимизацијом ензимског поступка хидролизе модел протеина и протеина брашна, успешно су унапређена функционална (способност формирања емулзија, својства пењења) и биолошка својства (антиоксидативна активност), као и смањена алергена својства глутена. Фракционисањем добијених

хидролизата добијени су биоактивни пептиди одређених молекулских маса који се истичу својим антиоксидативним активностима. Суплементација хељдиног безглутенског брашна добијеним хидролизатима протеинима брашна довела је до унапређења реолошких својстава на основу анализа помоћу Mixolab®-а. Резултати произашли из ове дисертације пружају увид у механизам деловања микроталаса на алергене епитопе глутена, њихову детекцију, структурну модификацију и аспекте потенцијалне примене. Такође произведени хидролизати протеина брашна успешно су примењени у реалном систему за формирање безглутенске замесе са унапређеним техно-функционалним и биолошким својствима. На основу свега наведеног може се закључити да ова дисертација својим резултатима представља искорак у практичној примени хидролизата глутена и отвара могућности за даља истраживања на ову тему.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Ивана В. Газикаловић је потврдила резултате истраживања добијених током израде своје докторске дисертације објављивањем радова у часописима међународног и националног значаја и саопштењима на међународним и националним скуповима. Као први аутор, резултате истраживања у оквиру ове дисертације објавила је у једном раду у врхунском међународном часопису (M21), једном раду у међународном часопису (M23), два саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34), једног саопштења са скупа националног значаја штампаном у изводу (M64) и једном раду у врхунском часопису националног значаја (M51). Поред тога, на основу резултата докторске дисертације направљен је прототип производа који је изложен на 65. Међународном сајму технике и техничких достигнућа у Београду и штампан је у каталогу (Нови безглутенски пекарски производи од модификованог пшеничног брашна, Играј за човечанство! Наука за све: каталог изложбене поставке, Центар за промоцију науке, 2023, стр. 37, ИСБН: 978-86-88767-47-7). Кандидат се бавио истраживачким радом у области биохемијског инжењерства и биотехнологије све време током израде дисертације, при чему је коаутор још три рада у истакнутом међународном часопису (M22), три саопштења са међународног скупа штампаних у целини (M33), пет саопштења са међународног скупа штампаних у изводу (M34), два рада у врхунском часопису националног значаја (M51), 2 саопштења са скупа националног значаја штампаних у целини (M63), 3 саопштења са скупа националног значаја штампаних у изводу (M64), једног новог техничког решења примењеног на међународном нивоу (M81) и једног пријављеног домаћег патента (M87).

Научни радови који су део дисертације:

Категорија M21:

1. **Ivana Gazikalović**, Jelena Mijalković, Nataša Šekuljica, Sonja Jakovetić Tanasković, Aleksandra Đukić Vuković, Ljiljana Mojović, Zorica Knežević-Jugović. Synergistic Effect of Enzyme Hydrolysis and Microwave Reactor Pretreatment as an Efficient Procedure for Gluten Content Reduction. *Foods*, 10(9), 2214, 2021 (IF=5,561) (doi:10.3390/foods10092214), (ISSN: 2304-8158)

Категорија M23:

1. **Ivana Gazikalović**, Jelena Mijalković, Nataša Šekuljica, Nevena Luković, Sonja Jakovetić Tanasković, Alina Culetu, Zorica Knežević-Jugović, Hydrolysis of soft wheat flour: Enhanced functional properties and the effect of starch on allergenicity reduction. *Journal of Food Processing and Preservation*, Vol. 46, Issue 10, e15925, 2022, (IF=2,609) (doi:10.1111/jfpp.15925), (ISSN: 0145-8892)

Категорија M33:

1. Jelena Jovanović, Andrea Stefanović, Nataša Šekuljica, **Ivana Gazikalović**, Nevena Luković, Sonja Jakovetić Tanasković, Zorica Knežević-Jugović, Modification of emulsifying properties and metal-ion chelating ability of gluten hydrolysates by partial enzymatic hydrolysis, Editors: Markoš, J., Mihal, M., In 46th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia, May 20-23, 2019., ISBN: 978-80-8208-011-0.

Категорија M34:

1. **Ivana Gazikalović**, Jelena Jovanović, Nataša Šekuljica, Nevena Luković, Sonja Jakovetić Tanasković, Zorica Knežević-Jugović, Optimization of submerged fermentation conditions for gluten-degrading enzyme production using *B. subtilis* isolate, Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - NUTRICON 2020, Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - NUTRICON 2020, Book of Abstracts, Vladimir Kakurinov (editor), Ohrid, Macedonia, 2. - 4. Sep, pp. 85 - 85, 2020 (ISBN: 978-608-4565-14-7)
2. **Ivana Gazikalović**, Jelena Mijalković, Nataša Šekuljica, Nevena Luković, Sonja Jakovetić Tanasković, Alina Culetu, Zorica Knežević-Jugović, Enzymatic hydrolysis of soft wheat flour: the effect of present solids on functional properties and allergenicity reduction. *7th International congress, Engineering, environment and materials in process industry EEM2021*, 17-19 March, Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, p. 90, 2021 (ISBN: 978-99955-81-38-1).

Категорија M51:

1. **Ivana Gazikalović**, Jelena Jovanović, Nataša Šekuljica, Nevena Luković, Sonja Jakovetić Tanasković, Zorica Knežević-Jugović. Optimization of submerged fermentation conditions for gluten-degrading enzyme production using *Bacillus subtilis* isolate. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, Vol. 34, pp. 186-191, 2021. (ISSN: 1857-8489)

Категорија M64:

1. **Ivana Gazikalović**, Nevena Luković, Jelena Bakrač, Sonja Jakovetić Tanasković, Jelena Mijalković, Nataša Šekuljica, Zorica Knežević-Jugović, Determining the potential of submerged fermentation on wheat bran for production of xylanase, International Conference on Biochemical Engineering and Biotechnology for Young Scientists, Belgrade, Serbia, 7-8. decembar, Book of abstracts, p. 38, 2023 (ISBN: 978-86-7401-389-2).

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Иване В. Газикаловић, мастер инж. технологије под називом „**Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава**“ сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публикавањем резултата на конференцијама од међународног и националног значаја. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „**Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава**“ кандидата Иване В. Газикаловић прихвати, изложи на увид

јавности и упути на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

Београд, 03.04.2024.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Др Душан Мијин, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Јелена Мијалковић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Маја Вукашиновић Секулић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Слађана Жилић, Научни саветник
Институт за кукуруз „Земун поље“, Београд