

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 20.9.2012. godine, određeni smo za članove Komisije za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije pod naslovom:

“RAZVOJ ENZIMSKOG POSTUPKA ZA SINTEZU METIL ESTARA MASNIH KISELINA ”

koju je predložila Nevena Luković (devojačko Ognjanović), dipl. inž. Na osnovu pregleda dokumentacije koju je dostavio kandidat Komisija podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

1. PODACI O KANDIDATU

Nevena Luković (devojačko Ognjanović) rođena je u Beogradu gde je završila osnovnu školu Kralj Petar I i III beogradsku gimnaziju. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1997/1998. godine. Diplomirala je na TMF-u na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 05.10.2004. sa ocenom na diplomskom radu 10 (deset) i prosečnom ocenom u toku studija 8,53. Po završetku redovnih studija, upisala je magistarske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Odlukom Nastavno-naučnog veća održanog 07.02.2008. godine prelazi sa magistarskih na doktorske studije Tehnološko-metalurškog fakulteta na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju (mentor dr Zorica Knežević-Jugović, van. prof). Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10,00, uključujući i završni ispit:

Predmet	ESPB	Ocena
1. Matematička obrada eksperimentalnih podataka	5	10
2. Hemijska kinetika	5	10
3. Odabrana poglavlja biohemije	5	10
4. Biohemijska kinetika	5	10
5. Industrijska mikrobiologija	5	10
6. Sanitarna mikrobiologija	4	10
7. Strukturna analiza organskih molekula	5	10
8. Imobilisani sistemi u biotehnologiji	4	10
9. Odabrana poglavlja hemije prirodnih organskih jedinjenja	4	10
10. Bioaktivne materije u kozmetičkim proizvodima	4	10
11. Biomasa kao izvor energije	4	10
12. Završni ispit	30	10

Od 2005. do 2007. godine Nevena Luković je kao istraživač pripravnik bila angažovana na naučno-istraživačkom projektu Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije pod nazivom "Razvoj tehnologije sinteze biodizela" ev. broj TR6742 u okviru programa za tehnološki razvoj. Od aprila 2008. do 2011. godine bila je zaposlena na projektu tehnološkog razvoja "Razvoj biotehnoloških postupaka za proizvodnju aditiva i novih formulacija za prehrambenu industriju" ev. broj TR20064 koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U tekućem projektnom ciklusu angažovana je na projektu "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti" ev. br. III 46010. Od školske 2005/2006. godine učestvuje u izvođenju vežbi iz predmeta "Industrijska mikrobiologija sa genetikom" i "Laboratorijski praktikum" na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju.

Nevena Luković je koautor poglavlja u knjizi međunarodnog značaja (M₁₄), šest naučnih radova u međunarodnim časopisima (jedan rad M₂₁, jedan rad M₂₂ i četiri rada M₂₃), rada u nacionalnom časopisu (M₅₁) i jedanaest saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (1 rad kategorija M₃₃, 1 rad M₃₄, 6 radova kategorije M₆₃ i 3 rada M₆₄).

Objavljeni naučni radovi i saopštenja

Poglavlje u knjizi međunarodnog značaja (M₁₄)

1. **N. Luković**, Zorica Knežević-Jugović, D. Bezbradica, "Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: recent trends, challenges and future perspectives", *Alternative Fuel*, ISSN 978-953-308-55-0.

Naučni radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M₂₁)

2. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability", *Bioresource Technology*, 100 (21) 5146-5154 (2009), ISSN 0960-8524; IF(2008)=4.453; IF(2010, petogodišnji)=4.901; *Biotechnology & Applied Microbiology* (18/145); *Agricultural Engineering* 1/9.

Naučni radovi u istaknutim međunarodnim časopisima, (M₂₂)

3. O. Ali Saied Moftah, S. Grbavčić, M. Žuža, **N. Luković**, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "Adding Value to the Oli Cake as a Waste from Oil Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (2012) 348-364, ISSN 0273-2289; IF (2010)=1.879; IF(2011, petogodišnji)=1.998; *Biology and Applied Microbiology* (79/160).

Naučni radovi u istaknutim međunarodnim časopisima, suplement (M_{22.1})

4. Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica, **N. Ognjanović**, "Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel in solvent free system with different acyl acceptors", *New Biotechnology*, 25 (S1) 159-160 (2010), ISSN 1871-6784; IF(2011)=2.756; IF(2011, petogodišnji)=2.867; *Biotechnology & Applied Microbiology* (55/158).

Naučni radovi u međunarodnim časopisima (M₂₃)

5. D. Bezbradica, I. Karalazić, **N. Ognjanović**, D. Mijin, S. Šiler-Marinković and Z. Knežević, "Studies on the specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed

esterification reactions in organic media", Journal of Serbian Chemical Society, 71(1) 31-41 (2006) ISSN 0352-5139; IF(2006)=0.536; IF(2007, petogodišnji)=0.591; Chemistry, Multidisciplinary (101/124).

6. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević, "Optimization of the production of biodiesel by a commercial immobilized lipase in a solvent free system using response surface methodology ", Journal of Serbian Chemical Society, 73 (2) 147–156 (2008), ISSN 0352-5139; IF(2009)=0.820; IF(2009, petogodišnji)=0.744; Chemistry, Multidisciplinary (87/140).

7. **N. Ognjanović**, S. Petrović, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela", Hemijska Industrija, 64 (1) 1-8 (2010), ISSN 0367-598X; IF(2010)=0.205; Engineering, Chemical (120/133).

8. M. Bradić, **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, S. Grbavčić, N. Avramović, D. Mijin, Z. Knežević-Jugović, "Enzimsko sinteza monoacilglicerola", Hemijska Industrija, 64 (5) 375-388 (2010), ISSN 0367-598X; IF(2010)=0.205; Engineering, Chemical (120/133).

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M₃₃)

9. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević, "Use of novel acyl acceptors in lipase-catalyzed biodiesel synthesis", Proceedings of the 35th International Conference of SSCHE, 2008, Tatranske Matliare, Slovakia, 228-1 – 228-6.

10. S. Grbavčić, **N. Ognjanović**, M. Žuža, O. Ali Saied Moftah, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "*Pseudomonas putida* lipase: production, properties and applicability as detergent additive", 39th conference of Slovak Society of Chemical Engineering, ISBN: 978-80-89475-04-9, High Tatras, Slovakia, 21-25 maj 2012.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M₃₄)

11. Z. Knežević, **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, "Immobilized *Rhizomucor miehei* lipase for biodiesel production in a solvent-free medium", "1st International Symposium on Environmental Biocatalysis", 2006, Cordoba, Spain, Book of Abstracts, P-56

Radovi u vodećim časopisima nacionalnog značaja (M₅₁)

12. **N. Ognjanović**, S. Šaponjić, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "Lipase catalyzed biodiesel synthesis with different acyl acceptors", APTEFF 39 (2008) 161-169, ISSN 1450-7188

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M₆₃)

13. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević, "Optimizacija enzimskog postupka sinteze biodizela imobilisanom lipazom iz *Candida antarctica*", Zbornik radova prezentovanih u okviru 45. savetovanja SHD, 2007., Novi Sad, 69-72

14. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević, "Primena novih acil akceptora u procesu enzimski katalizovane sinteze biodizela ", Zbornik radova prezentovanih u okviru 46. savetovanja SHD, 2008., Beograd, 55-58.

15. M. Bradić, **N. Ognjanović**, N. Avramović, D. Bezbradica, D. Mijin, I. Karadžić, Z. Knežević-Jugović, "Enzimsko dobijanje monoacilglicerola glicerolizom suncokretovog ulja", Zbornik radova prezentovanih u okviru 48. savetovanja SHD, 2010., Novi Sad, 196-199

16. **N. Ognjanović**, S. Grbavčić, M. Žuža, Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica, "Primena modifikacije nosača Eupergit® C 250 L cisteinom i glutaraldehidom u imobilizaciji lipaze iz *C. rugosa*", konferencija Biotehnologija za održivi razvoj, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2010, 37-40
17. S. Grbavčić, Omar Ali Saied, J. Jovanović, **N. Ognjanović**, M. Žuža, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "Proizvodnja lipaza i proteaza iz *Candida utilis* tehnikom gajenja na čvrstoj podlozi", konferencija Biotehnologija za održivi razvoj, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 49-52
18. Omar Ali Saied Moftah, Sanja Grbavčić, **N. Luković**, Milena Žuža, Dejan Bezbradica, Zorica Knežević-Jugović, "Karakterizacija lipaze iz *Candida utilis* dobijene tehnikom gajenja na čvrstoj podlozi korišćenjem uljane pogače maslina kao supstrata", Zbornik radova prezentovanih u okviru 49. savetovanja SHD, Kragujevac, 13-14. 05. 2011, 151-154

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M₆₄)

19. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević, „Optimizacija procesa sinteze biodizela katalizovana lipazama², XLIV Savetovanje SHD, Beograd, 2006, Izvodi radova, BT-P05, 32.
20. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević, „Optimizacija procesa sinteze biodizela imobilisanom lipazom iz *Candida antarctica* u sistemu bez organskog rastvarača“, VII simpozijum Savremene tehnologije i privredni razvoj, Leskovac, 2007, Zbornik izvoda radova, BIH-4/BE-4, 36
21. Z. Knežević-Jugović, **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, „Sinteza biodizela u sistemu bez organskog rastvarača primenom novih acil akceptora, „Čistije tehnologije i novi materijali“, Beograd, 2008, Knjiga izvoda radova, C10, 70.

Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Na osnovu dosadašnjeg rada i pokazanih rezultata tokom poslediplomskih studija i u okviru naučno-istraživačkog rada na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, TR20064 (2008-2011) i III46010 (2011-2014), Nevena Luković, dipl. inženjer tehnologije, pokazala je sklonost i izrazitu sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Takođe, tema doktorske disertacije pripada oblasti iz koje je objavila poglavlje u knjizi međunarodnog značaja pisano po pozivu (M14), 6 naučnih radova štampanih u međunarodnim časopisima i 11 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima, što ukazuje da je ispunila potrebne uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije. Pored toga, kandidat poseduje odlično znanje engleskog jezika i ima iskustva u korišćenju različitih softverskih paketa za statističku obradu rezultata.

2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Predmet i cilj istraživanja ove doktorske disertacije su razvoj enzimskog postupka sinteze metil estara masnih kiselina (biodizela) iz ulja, postupkom transesterifikacije. Biodizel je tečno gorivo, proizvedeno iz poljoprivrednih kultura, koje u potpunosti može da zameni fosilno gorivo u motorima sa unutrašnjim sagorevanjem. Biodizel je obnovljiv izvor energije i njegovim korišćenjem smanjuje se potreba za fosilnim dizelom čime se čuvaju rezerve i umanjuje rizik od

snabdevanja. On je biorazgradiv, nije toksičan, CO₂ neutralan (ne pridonosi efektu staklene bašte), a njegova primena doprinosi smanjenju emisije štetnih supstanci u urbanim sredinama. Biodizel ne sadrži sumpor, a pri njegovom sagorevanju smanjena je emisija čađi, benzola, toluola, kao i štetnih azotnih jedinjenja. Sa ekološkog aspekta biodizel gorivo ne zagađuje životnu sredinu, jer se pri sagorevanju ovog goriva proizvodi onoliko ugljen-dioksida koliko biljke, iz kojih je dobijen, vezuju iz atmosfere.

Stalno povećanje potrošnje nafte u svetu traži pronalaženje novih izvora energije. Nedostatak nafte na tržištu će neminovno uticati na povećanje njene cene i zbog toga je neophodno tražiti zamenu za fosilna goriva u novim održivim izvorima. Moguća rešenja za smanjenje zavisnosti o nafti je uvođenje alternativnih goriva. Postoji više vrsta goriva koja se trenutno istražuju. Biodizel ima veliku prednost zato što se može koristiti u već postojećim vozilima bez ikakve ili sa malim modifikacijama postojećih motora, što zavisi od koncentracije biogoriva. Evropske zemlje su prepoznale potrebu za alternativnim gorivima i izdale su Direktivu o promociji korišćenja biogoriva i drugih obnovljivih goriva za transport. Direktiva predviđa da zemlje članice EU zamene 5,75% fosilnih goriva alternativnim gorivima do 31. decembra 2010. Ova Direktiva je dopunjena direktivom 2009/28/EC koja takođe promoviše korišćenje energije iz obnovljivih izvora i ima za cilj da do 2020., 20% utrošene energije bude iz obnovljivih izvora.

Najzastupljeniji postupak za dobijanje biodizela u industriji je hemijska transesterifikacija biljnih ulja metanolom u prisustvu alkalnog (NaOH, KOH) ili kiselog katalizatora (koncentrovana sumporna kiselina). Hemijski postupak za sintezu biodizela koristi se u industrijskim razmerama već decenijama, ali su uočeni izvesni nedostaci u ovakvom načinu proizvodnje: veliki energetske utrošci, stvaranje nusprodukata u sporednim reakcijama, potreba za neutralizacijom katalizatora i izdvajanje nastalog glicerola iz reakcione smeše. Tokom reakcije metanolize stvaraju se sapuni koji se moraju ispirati vodom i čije prisustvo znatno otežava separaciju proizvoda. Nedostaci konvencionalnog pristupa katalize u homogenim sistemima mogu se prevazići na nekoliko načina kao što su primena heterogenih katalizatora (hidroksidi i oksidi zemnoalkalnih metala), odvijanje reakcije transesterifikacije pod uslovima natkritičnog fluida i korišćenjem enzima (lipaza) kao biokatalizatora.

Predmet savremenih istraživanja je primena enzima, i to lipaza, za transesterifikaciju ulja ili masti metanolom u cilju dobijanja biodizela. Enzimski postupci imaju nekoliko prednosti u odnosu na hemijske: blagi reakcioni uslovi, manji troškovi za energiju, mogućnost primene nerafinisanih ulja i masti jer se ne stvaraju sapuni, olakšani postupci prečišćavanja proizvoda i, u većini slučajeva, dobijanje proizvoda boljeg kvaliteta. Naime, slobodne masne kiseline mogu se u potpunosti prevesti u metil estre, bez formiranja sapuna, i na taj način povećati prinos biodizela. Ova karakteristika enzima omogućava korišćenje materijala sa visokim sadržajem slobodnih masnih kiselina ili visokim sadržajem vode, kao što su nejestiva ulja, otpadna ulja za kuvanje i industrijska otpadna ulja. Takođe, korišćenjem biokatalizatora nema potrebe za ispiranjem proizvoda u završnoj fazi sinteze biodizela i njegovog prečišćavanja, pa se smanjuje količina otpadne vode koja predstavlja ozbiljan ekološki problem.

Međutim, iako je postalo jasno da se radi o veoma perspektivnoj tehnologiji koja će u potpunosti potisnuti hemijsku, još uvek nisu postignuti odgovarajući kapaciteti proizvodnje zbog malih prostorno-vremenskih prinosa reaktora i male stabilnosti enzima u prisustvu nižih alkohola. U cilju prevazilaženja ovih problema nastavljaju se istraživanja u pravcu stabilizacije enzima imobilizacijom na različite

nosače ali i optimizacijom procesnih parametara i načina odvijanja procesa, naročito režima dodavanja nižih alkohola i konfiguracije bioreaktora. U ovoj doktorskoj disertaciji će se analizirati nekoliko aspekta poboljšanja efikasnosti enzimске katalizovane transesterifikacije: optimizacija procesnih parametara i načina izvođenja procesa, razvoj reakcionog sistema bez organskog rastvarača, mogućnost primene drugih acil-akceptora umesto metanola, mogućnost stabilizacije enzima imobilizacijom na različite nosače i izbor reaktorskog sistema.

Prvi deo disertacije biće posvećen odabiru adekvatnog biokatalizatora-lipaze za odvijanje reakcije metanolize suncokretovog ulja i ispitivanje uticaja različitih parametara na brzinu reakcije katalizovane enzimom u šaržnom sistemu. Ispitaće se katalitičko dejstvo lipaza iz različitih izvora sa aspekta transesterifikacione aktivnosti i stabilnosti u sistemima bez organskog rastvarača. U tom cilju koristiće se komercijalne lipaze iz različitih mikroorganizama (*Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*), kao i neke komercijalne imobilisane lipaze i lipaze prethodno dobijene iz sopstvenog proizvodnog soja (*Pseudomonas aeruginosa* san-ai). Isto tako, nakon odabira biokatalizatora, ispitaće se uticaji temperature, sadržaja vode u sistemu, količine dodatog enzima, molarnog odnosa metanol/ulje kao i način izvođenja procesa na prinos metil estara masnih kiselina. Da bi se procenio uticaj različitih faktora na prinos biodizela primeniće se metoda višefaktornih eksperimentalnih planova (centralni kompozicioni rotabilni plan) koja omogućava da se utvrdi uticaj nekoliko faktora istovremeno, te da se odredi intenzitet tih uticaja kao i njihova moguća interakcija.

Slaba rastvorljivost nižih alkohola (metanola, etanola) u ulju i njihov negativan uticaj na lipaze zahtevaju da se oni u reakcionu smešu postepeno unose. U skladu sa tim na osnovu pregleda literature uočava se da su razvijeni različiti višestepeni postupci postepenog dodavanja metanola u reakcionu smešu u skladu sa dinamikom njegove potrošnje. Međutim, u ispitivanjima su se uglavnom koristili sistemi organskih rastvarača zbog nekih prednosti ovih reakcionih sistema uključujući veću termostabilnost enzima zbog niskog sadržaja vode, veću rastvorljivost supstrata, veće brzine reakcija i smanjenu inhibiciju enzima polarnim supstratima i proizvodima reakcije. Pored značajnih prednosti sistema bez organskog rastvarača, za industrijsku primenu interesantniji su sistemi bez organskog rastvarača iz ekonomskih i tehnoloških razloga jer se postižu uštede zbog smanjenja neophodne zapremine bioreaktora i olakšanog izolovanja finalnog proizvoda. Pored toga, izbegava se recirkulacija organskog rastvarača koja stvara teškoće u tehnološkom usaglašavanju rada pojedinih uređaja i značajno opterećuje ukupne troškove procesa. Zbog toga, u radu će se ispitati mogućnost višestepenog dodavanja polarnih reaktanata u skladu sa dinamikom njihove potrošnje da bi se sprečila inhibicija enzima kao i različite strategije u cilju efikasnog regulisanja sadržaja vode u sistemu. Druga mogućnost je korišćenje drugih acil akceptora umesto metanola koji nemaju negativno dejstvo na enzim kao alkoholi kratkog lanca. Kao pogodni nukleofili analiziraće se metil- i etil-acetat, butanol i drugi. Primenom ovih acil akceptora čak je hipotetički moguće izvoditi jednostepeni postupak sinteze biodizela, i time znatno smanjiti vreme trajanja reakcije i njenu kompleksnost izvođenja, a da ne dođe do inhibicije enzima. Takođe, primenom metil-acetata potencijalno je moguće povećati operativnu stabilnost imobilisanog enzima i omogućiti njegovu višekratnu upotrebu u uzastopnim ciklusima. Naime, u reakciji sa metil-acetatom kao nusprodukt se ne stvara glicerol, već triacetilglicerol koji nema negativan efekata na stabilnost lipaze.

Drugi deo rada će se fokusirati na tehnike imobilizacije odabrane lipaze. Imobilizacijom enzima na čvrste nosače može se dobiti stabilan biokatalizator koji se

može koristiti više puta u ponovljenim ciklusima u šaržnim sistemima, što značajno smanjuje potrošnju enzima i troškove proizvodnog postupka. Pored toga, enzim se obično stabilizuje u toku imobilizacije pa se može primeniti veća količina metanola, etanola ili drugih acil akceptora, a da ne dođe do inaktivacije enzima. U radu će se analizirati kovalentna imobilizacija native lipaze iz *Candida antarctica* na polimernim nosačima koji sadrže epoksidne grupe i afinitet dobijenog imobilisanog enzima prema supstratima. Komercijalni nosači će se prethodno hemijski modifikovati pomoću cisteina i glutaraldehida, kao i na već uobičajen način pomoću etilendiamina i glutaraldehida, radi uvođenja novih funkcionalnih grupa na nosač što bi omogućilo vezivanje enzima preko većeg broja aminokiselinskih ostataka i time dobijanje stabilnijih biokatalizatora. U poslednjem delu rada istraživanja će biti usmerena u pravcu optimizacije reaktorskog sistema i operativnih uslova za izvođenje reakcije. Kako je moguće ostvariti veću produktivnost sistema po masi enzima u protočnim reaktorskim sistemima nego u šaržnom sistemu, ispitaće se reakcija sa imobilisanim enzimom u reaktoru sa pakovanim slojem. Ispitivaće se uticaji različitih procesnih parametara i načina mešanja i izvođenja procesa kao i režima rada bioreaktora na produktivnost imobilisanog sistema.

Poslednjih decenija publikovan je veliki broj radova koji se bavi tematikom enzimске sinteze metil estara masnih kiselina i koji sa različitih aspekata tretiraju datu problematiku. Ovde su navedeni samo neki radovi koji su povezani sa enzimskom sintezom biodizela a koji predstavljaju polaznu osnovu za dalje istraživanje u ovoj disertaciji:

1. Al-Zuhair, S., 2007. Biofuels Bioprod. Bioref. 1, 57-66.
2. Antolin, G, Tinaut, F.V., Briceno, Y., Castano, V., Perez, C., Ramirez, A.I., 2002. Bioresource Technol. 83, 111-114.
3. Dizge, N., Aydinler, C., Imer, D.Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., Keskinler, B., 2009. Bioresource Technol. 100, 1983-1991.
4. Du, W., Xu, Y., Liu, D., Zeng, J., 2004. J. Mol. Catal. B: Enzym. 30, 125-129.
5. Halim, S.F.A., Kamaruddin, A.H., Fernando, W.J.N., 2009. Bioresource Technol. 100, 710-716.
6. Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., Prodanovic, R., 2006. Biochem. Eng. J. 30, 269-278.
7. Mittelbach, M., 1990. J. Am. Oil Chem. Soc. 67, 168-170.
8. Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V., 2005. J. Biotechnol. 119, 291-299.
9. Tamalampudi, S., Talukder, M.R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A. Fukuda, H., 2007. Biochem. Eng. J. 39, 185-189.
10. Soumanou, M.M., Bornscheuer, U.T., 2003. Enzyme. Microb. Technol. 33, 97-103.
11. Rathore, V., Madras, G., 2007. Fuel 86, 2650-2659.
12. Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K., 2008. Bioresource Technol. 99, 3975-3981.
13. Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F., 2007. Renew Sust. Energy Rev. 11, 1300-1311.
14. Lu, J., Nie, K., Wang, F., Tan, T., 2008. Bioresource Technol. 99, 6070-6074.
15. Hernandez-Martin, E., Otero, C., 2008. Bioresource Technol. 99, 277-286.

3. Polazne hipoteze

Rad na ovoj doktorskoj disertaciji osmišljen je pod pretpostavkom da se enzimi, tačnije lipaze, mogu uspešno implementirati kao biokatalizatori u procesima transesterifikacije masnih kiselina u sistemima bez organskih rastvarača zahvaljujući

činjenici da mogu katalizovati i reakcije hidrolize i esterifikacije u ovim sistemima. Lipaze dobijaju sve veći značaj u brojnim biotehnološkim procesima, pa i u sintezi biodizela zbog velike specifičnosti i aktivnosti enzima pod blagim procesnim uslovima. Pretpostavka je da je pomoću lipaze moguće ostvariti visoke prinose biodizela u energetski manje zahtevnim sistemima u odnosu na hemijski katalizovane procese.

Prvi deo disertacije biće posvećen odabiru adekvatnog biokatalizatora-lipaze za odvijanje reakcije metanolize suncokretovog ulja i ispitivanju uticaja različitih parametara na brzinu reakcije katalizovane nativnim enzimom u šaržnom sistemu bez organskog rastvarača. Nakon odabira biokatalizatora, u radu će se analizirati nekoliko aspekata poboljšanja efikasnosti enzimske katalizovane reakcije transesterifikacije suncokretovog ulja: dinamika dodavanja alkohola kratkog lanca, razvoj sistema bez organskog rastvarača, izbor novog acil-akceptora, izbor reaktorskog sistema i imobilizacija enzima na različite nosače. Primena imobilisanih lipaza može da doprinese ukupnim tehnološkim performansama i ekonomiji procesa jer se time u većini slučajeva omogućava višekratna upotreba enzima, stabilizacija enzima i kontinualno izvođenje reakcije u reaktorima sa pakovanim i fluidizovanim slojem. Međutim, nije svaka imobilizacija enzima ekonomski i tehnološki opravdana. Samo imobilisani enzim koji je stabilan u dovoljno dugom periodu skladištenja i primene može da nadoknadi gubitak aktivnosti i troškove u toku imobilizacije. Zbog toga, u drugom delu doktorske disertacije ispitaće se nekoliko postupaka imobilizacije lipaza na komercijalnim nosačima koji hipotetički treba da omoguće dobijanje aktivnog i stabilnog biokatalizatora za primenu u reakciji sinteze metil estara masnih kiselina u sistemima bez organskog rastvarača. Odabrane su sledeće hipoteze sa kojima se započinje istraživanje u ovoj disertaciji i to:

- Biodizel (metil estri viših masnih kiselina) se danas pretežno proizvodi u šaržnim reaktorima, u procesnim postrojenjima uz primenu koncentrovanih kiselina kao katalizatora. Zahvaljujući velikoj specifičnosti enzima kao katalizatora, optimizovani enzimski proces treba da omogući dobijanje proizvoda boljeg kvaliteta uz značajno manje obrazovanje toksičnih nusproizvoda i hemijskog otpada što je u skladu sa principima zaštite života i zdravlja ljudi, zaštite životne sredine i prirodnih resursa;
- Reakcija transesterifikacije suncokretovog ulja izводиće se u sistemima bez organskog rastvarača što će dodatno doprineti ukupnim tehnološkim performansama i ekonomiji procesa;
- Lipaze produkovane iz prirodno stabilnih sojeva i same treba da budu stabilne u nepovoljnim uslovima kakva je sredina pri sintezi biodizela (mali sadržaj vode, prisustvo polarnih supstrata), tako da će se u reakciji ispitivati lipaze mikrobnog porekla;
- Dodatno smanjenje operativnih troškova zbog mogućnosti izvođenja jednostepenog enzimskog procesa i povećanje stabilnosti biokatalizatora može se postići primenom drugih acil akceptora umesto metanola kao supstrata u enzimskom procesu uz istovremeno povećanje operativne stabilnosti enzima;
- Primena imobilisanih lipaza doprineće dodatnoj stabilizaciji enzima i omogućiće višekratnu upotrebu enzima u šaržnom procesu i/ili kontinualno izvođenje reakcije u reaktorima sa pakovanim i fluidizovanim slojem;
- Proizvedeni biodizel enzimskim procesom biće odgovarajućeg kvaliteta u skladu sa propisanim tehničkim i drugim zahtevima za tečna goriva.

4. Naučne metode istraživanja

Prinosi metil estara masnih kiselina ostvareni enzimskom transesterifikacijom ulja će biti praćeni metodom gasne hromatografije. Uzorci će biti pripremani po već utvrđenom postupku sa internim standardom. Promena ukupnog sadržaja slobodnih masnih kiselina u smeši biće praćena određivanjem kiselinskog broja ulja/masti.

Za dobijanje i karakterizaciju imobilisanih enzima koristiće se savremene hemijske i instrumentalne metode. Svi postupci hemijske modifikacije enzima kao i imobilizacije enzima će se izvoditi prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature. Dobijeni imobilisani enzimi će se okarakterisati prema standardnim metodama za određivanje termostabilnosti i operativne stabilnosti, pH i temperaturnog profila, dok će se obrazovanje hemijskih veza između enzima i nosača potvrditi FT-IR spektroskopijom. Standardna aktivnost lipaza će se određivati spektrofotometrijskom metodom pri čemu će se koristiti *p*-nitrofenil-palmitat kao supstrat, dok će se sadržaj proteina određivati standardnom spektrofotometrijskom metodom po Loriju.

Za optimizaciju procesnih parametara u različitim sistemima (sistemi bez organskih rastvarača sa metanolom ili drugim acil-akceptorom, šaržni sistem, protočni reaktor) koristiće se metode planiranih eksperimenata koje se zasnivaju na istovremenoj promeni većeg broja parametara, ali u skladu sa prethodno odabranim eksperimentalnim planom što omogućuje pouzdaniju optimizaciju procesnih parametara u širem intervalu uz značajno smanjenje broja eksperimenata i potrošnje skupih hemikalija. Pored toga, statistički metod omogućuje dobijanje odgovarajućih matematičkih modela na osnovu kojih može da se predvidi ponašanje sistema u zavisnosti od procesnih parametara i omogućuje pouzdana kontrola i regulacija procesa.

5. Očekivani naučni doprinos

Očekuje se da će rezultati u okviru ove doktorske disertacije dati značajan naučni doprinos implementiranju enzima u procese sinteze biodizela. Po završetku predloženih istraživanja može se očekivati sledeći osnovni naučni doprinos:

- Razvoj originalnog tehnološkog postupka za proizvodnju metil estara masnih kiselina (biodizela) koji je zasnovan na primeni lipaza kao biokatalizatora procesa, što podrazumeva sledeće pojedinačne doprinose:

- Izabraće se najefikasniji biokatalizatora za izvođenje reakcije transesterifikacije suncokretovog ulja u cilju proizvodnje biodizela;
- Izvršiće se selekcija najboljeg acil akceptora koji ima pozitivan uticaj na operativnu stabilnost sistema i omogućava uprošćavanje tehnološkog postupka;
- Razviće se nekoliko sistema sa imobilisanim lipazama za primenu u datim reakcijama u industrijski prihvatljivim sistemima bez organskih rastvarača;
- Utvrdiće se optimalni procesni parametri enzimskih reakcija i odgovarajući kinetički parametri;
- Utvrdiće se optimalan način rada i konstrukcije bioreaktora za proizvodnju metil estara masnih kiselina.

Pored ovog osnovnog naučnog doprinosa, rezultati koji će proisteći iz ove disertacije doprineće razumevanju inaktivacije enzima u prisustvu polarnih jedinjenja i pronalaženju načina za njihovu stabilizaciju u ovim sistemima. Pored toga, istraživanja će doprineti razvoju novih tehnika imobilizacije i imobilisanih sistema sa

lipazama. Ovo može da bude od značaja i pri izvođenju drugih enzimskih reakcija koje se izvođe u sistemima sa niskim sadržajem vode i u prisustvu polarnih supstrata.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Predmet rada ove doktorske disertacije je razvoj enzimskog postupka sinteze metil estara masnih kiselina. Ispitaće se uticaj osnovnih parametara na prinos biodizela kao što su temperatura, molarni odnos metanol/ulje, količina vode i koncentracija enzima, pri čemu će biti primenjena metoda planiranog eksperimenta i matematičko-statistička obrada eksperimentalnih podataka. Isto tako, u cilju određivanja stabilnosti imobilisanog enzima, ispitaće se i mogućnost njegove reciklacije u ponovljenim ciklusima transesterifikacije. U drugom delu rada će se analizirati uticaj različitih acil akceptora na aktivnost i stabilnost enzimskog sistema. Takođe, ispitiće se procesni parametri i načini izvođenja procesa kao i režimi rada bioreaktora. U poslednjem delu rada analiziraće se mogućnost primene nekoliko novih i konvencionalnih tehnika imobilizacije lipaza koje se zasnivaju na hemijskoj aktivaciji epoksidnog nosača u cilju uvođenja novih funkcionalnih grupa na nosač čime bi se omogućilo dobijanje stabilnijih biokatalizatora u procesu sinteze biodizela. Predviđa se da će u doktorskoj disertaciji biti obrađena sledeća poglavlja: *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija*, *Zaključak*, *Literatura*. U poglavlju *Uvod* biće definisani glavni ciljevi disertacije, predmet istraživanja i doprinos disertacije.

Teorijski deo doktorske disertacije obuhvatiće analizu predhodnih istraživanja koja se odnose na:

- upotrebu alternativnih goriva;
- standarde kvaliteta biodizel goriva;
- sirovine za proizvodnju biodizela;
- kiselo katalizovane transesterifikacije;
- bazno katalizovane transesterifikacije;
- enzimске postupke sinteze biodizela;
- svojstva lipaza od značaja u proizvodnji biodizela;
- imobilizacija lipaza i primena imobilisanih lipaza u sintezi biodizela.

U *Eksperimentalnom delu* biće navedene metode korišćene u eksperimentalnom radu:

- Materijali i hemikalije korišćene u radu;
- Opis eksperimentalnih tehnika;
- Uslovi sinteze metil estara masnih kiselina u šaržnom i protočnom reaktorskom sistemu;
- Uslovi imobilizacije enzima na nosače.

U poglavlju *Rezultati i diskusija* biće prikazani i diskutovani rezultati ispitivanja procesa enzimske reakcije transesterifikacije:

- Selekcija biokatalizatora;
- Selekcija optimalnih procesnih parametara i statistička obrada podataka;
- Izbor acil akceptora i uticaj na način izvođenja procesa i operativnu stabilnost enzimskog sistema;
- Imobilizacija enzima na modifikovanim komercijalnim nosačima;
- Optimizacija režima rada i konfiguracije reaktorskog sistema.

U *Zaključku* će biti sumirani dobijeni rezultati, izvedeni na osnovu izvršenih ispitivanja.

Literatura će sadržati navode citirane u disertaciji, kao i radove proistekle istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije.

7. Zaključak i predlog

Na osnovu izloženog Komisija smatra da je tema predložene doktorske disertacije pod naslovom “Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina” koju je predložila Nevena Luković dipl. inž., naučno zasnovana i da predstavlja značajan naučni doprinos naučnoj oblasti Tehnološkog inženjerstva za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da kandidatu Neveni Luković odobri izradu doktorske disertacije pod navedenim naslovom.

Za mentora pri izradi doktorske disertacije predlaže se dr. Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 15.10.2012.

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Zorica Knežević-Jugović, van. prof.
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Dejan Bezbradica, docent
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Ljiljana Mojović, red. prof.
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Dr Mirjana Antov, red.prof
Tehnološki fakultet, Novi Sad