

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Predmet: Podobnost teme kandidata Mr. Olivera Prodanović za izradu doktorske disertacije

Na sednici Nastavno–naučnog veća Tehnološko–metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 27.12.2012. godine, imenovani smo za članove Komisije za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije pod naslovom:

“RAZVOJ IMOBILISANIH SISTEMA PEROKSIDAZE IZ RENA (*Amoracia rusticana*) ZA POLIMERIZACIONE REAKCIJE I UKLANJANJE FENOLA IZ OTPADNIH VODA”

koju je predložila Mr. Olivera Prodanović. Na osnovu materijala priloženog uz Zahtev kandidata, Komisija Nastavno–naučnom veću podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografski podaci

Olivera Prodanović, magistar multidisciplinarnih nauka Univerziteta u Beogradu, rođena je 13. novembra 1973. godine u Čačku. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Lučanima 1992. godine. Studije na Biološkom fakultetu u Beogradu (smer Zaštita, obnova i unapređivanje životne sredine) upisala je iste godine i diplomirala 18.07.2000. godine na Katedri za Ekologiju i geografiju životinja, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu sa ocenom na diplomskom radu 10 (deset) i prosečnom ocenom u toku studija 8,26.

Magistarske studije na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, osek Biofizika, upisala je školske 2003/04. godine. Treba imati u vidu da je tokom rada na magistarskoj tezi boravila dve godine na porodiljskom i dve godine na neplaćenom odsustvu u Nemačkoj. Položila je sve ispite predviđene planom i programom magistarskih studija sa prosečnom ocenom 9,28 i odbranila magistarsku tezu 27.04.2010. godine pod nazivom „ANTIOKSIDATIVNI ENZIMI TOKOM KLIJANJA SEMENA PANČICEVE OMORIKE (*Picea omorika* (Panc) Purkinje) U FIZIOLOŠKIM I USLOVIMA STRESA IZAZVANOG VISOKIM KONCENTRACIJAMA KADMIJUMA“.

Od 16.04.2004. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač- saradnik izabrana je 24. aprila 2009. godine. Tokom dosadašnjeg istraživačkog rada na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, učestvovala je na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, broj 1911 - „Čelijski odgovor na stres kod drveća izazvan zagađenjem: Mogućnost primene u biomonitoringu životne sredine“ (2004.-2005.), i na projektu broj 143043 - „Ispitivanja novih biosenzora za monitoring i dijagnostiku biljaka“ (2006.-2010.), a u novom projektnom ciklusu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije angažovana je na projektu 173017 – „Ispitivanje odnosa

struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom“ (2011.–2014.).

Čita, piše i govori engleski i nemački jezik.

1.2. Stečeno naučnoistraživačko iskustvo

Olivera Prodanović je odbranila Magistarsku tezu 27.04.2010. godine pod nazivom “ANTIOKSIDATIVNI ENZIMI TOKOM KLIJANJA SEMENA PANČIĆEVE OMORIKE (*Picea omorika* (Panč) Purkyně) U FIZIOLOŠKIM I USLOVIMA STRESA IZAZVANOG VISOKIM KONCENTRACIJAMA KADMIJUMA“ pod mentorstvom prof. Dr Mihajla Spasić i Dr Ksenije Radotić Hadži-Manić iz multidisciplinarnih naučnih oblasti (Upravljanje životnom sredinom). Iz navedene teze direktno su proizašla 2 rada štampana u međunarodnim časopisima kategorizacije M23 i jedan rad u nacionalnom časopisu (M52). U toku izrade teze, kandidat je stekla iskustvo u radu sa antioksidativnim enzimima (peroksidaza, katalaza i superoksid-dizmutaza) i to njihovoj izolaciji iz prirodnih materijala, prečišćavanju i karakterizaciji. Ove tehnike, posebno vezane za enzim peroksidazu, bi bile od velikog značaja za izradu predložene doktorske disertacije kandidata čiji je predmet rada izolacija i karakterizacija oksido-redukcionog enzima (peroksidaze), njena imobilizacija i primena u reakcijama polimerizacije i uklanjanju fenola iz otpadnih voda.

Spisak objavljenih i saopštenih naučnih i stručnih radova

Naučni radovi objavljeni u vodećim časopisima međunarodnog značaja (M₂₂)

1. **Prodanović O.**, Prokopijević M., Spasojević D., Stojanović Ž., Radotić K., Knežević-Jugović Z., Prodanović R: Improved covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate-based copolymers, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol 168, No 5, 2012, pp. 1288-1301. Paper ISSN: 0273-2289, IF(2011) 1,943.

Naučni radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M₂₃)

1. **Prodanovic O.**, Prodanovic R., Bogdanovic Pristov J., Mitrovic A., Radotic K.: Effect of cadmium stress on antioxidative enzymes during germination of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně], African Journal of Biotechnology, Vol 11, No 52, 2012, pp. 11377-11385. Paper ISSN: 1684-5315, IF(2010) 0,573.
2. **Prodanović O.**, Prodanović R., Bogdanović J., Mitrović A., Milosavić N., Radotić K.: Antioxidative enzymes during germination of two lines of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně], Archives of Biological Sciences, Vol 59, No 3, 2007, pp. 209-216. Paper ISSN: 0354-4664, IF(2009) 0,238.
3. Prodanovic R., Milosavic N., Jovanovic S., **Prodanovic O.**, Cirkovic Velickovic T., Vujcic Z., Jankov M.J.: Activity and stability of soluble and immobilized α -glucosidase from baker's yeast in cosolvent systems, Biocatalysis and Biotransformation, Vol 24, No 3, 2006, pp. 195-200. Paper ISSN: 1024-2422, IF(2006) 1,437.

4. Moftah Omar A.S., Grbavčić, S.Ž., Moftah Walid A.S., Luković N.D., **Prodanović O.L.**, Jakovetić S.M., Knežević-Jugović Z.D.: Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates, Journal of the Serbian Chemical Society, in press, 2013, doi:10.2298/JSC120905005M. Paper ISSN IF(2011) 0,879.

Naučni rad objavljen u časopisima nacionalnog značaja (M₅₂)

1. Prodanović R., Gavrović-Jankulović M., Kovačević G., Blazić M., **Prodanović O.**, Ostafe R. Nanobiocatalysts for biofuel cells and biosensor systems, Vojnotehnički glasnik, Vol 59, No 4, 2011, pp. 79-92. ISSN 0042-8469, UDK 623+355/359.
2. Bogdanović J., Prodanović R., Milosavić N., **Prodanović O.**, Radotić K.: Multiple forms of superoxide dismutase in the apoplast and whole-needle extract of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně], Archives of Biological Sciences, Vol 58, No 4, 2006, pp. 211-214. ISSN 0354-4664.

Naučni rad saopšten na skupu međunarodnog značaja, štampan u celini (M₃₃)

1. **Prodanović, O.**, Prokopijević, M., Spasojević, D., Prodanović, R., Stojanović, Ž., Radotić Hadži-Manić, K.: "Immobilization of horse radish peroxidase on different macroporous glycidyl methacrylates for wastewater treatment", Zbornik referata, rezimea referata i poster prezentacija sa Naučnog kongresa: Zaštita prirode u XXI vijeku, Žabljak 2011, Crna Gora, Knjiga BR2, str. 709-711.
2. Spasojević, D., Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Radotić Hadži-Manić, K., Prodanović, R.: "Poređenje dve metode za imobilizaciju HRP u alginatu za prečišćavanje otpadnih voda", Zbornik referata, rezimea referata i poster prezentacija sa Naučnog kongresa: *Zaštita prirode u XXI vijeku*, Žabljak 2011, Crna Gora, Knjiga BR2, str. 653-656.
3. Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Spasojević, D., Prodanović, R., Stojanović, Ž., Radotić Hadži-Manić, K.: "Optimizacija uslova za glutaraldehidnu imobilizaciju peroksidaze iz soje", Zbornik referata, rezimea referata i poster prezentacija sa Naučnog kongresa: *Zaštita prirode u XXI vijeku*, Žabljak 2011, Crna Gora, Knjiga BR2, str. 697-700.

Naučni rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampani u celini (M₆₃)

1. **Prodanović, O.**, Prokopijević, M., Spasojević, D., Stojanović, Ž., Radotić, K., Knežević-Jugović, Z., Prodanović, R.: "Covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate based copolymer", Knjiga radova sa 50. Jubilarnog Savetovanja Srpskog Hemijskog Društva, Beograd 2012, ISBN: 978-86-7132-049-8, str. 195-198.
2. Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Spasojević, D., Stojanović, Ž., Radotić Hadži-Manić, K., Prodanović, R.: "Poređenje imobilizacije peroksidaze soje na različite

glicidil metakrilat polimere", Knjiga radova sa 50. Jubilarnog Savetovanja Srpskog Hemijskog Društva, Beograd 2012, ISBN: 978-86-7132-049-8, str. 191-194.

3. Spasojević, D., Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Radotić Hadži-Manić, K., Prodanović, R: "Poređenje četiri metode za imobilizaciju HRP u alginatu radi potencijalne primene u prečišćavanju otpadnih voda", Knjiga radova sa 50. Jubilarnog Savetovanja Srpskog Hemijskog Društva, Beograd 2012, ISBN: 978-86-7132-049-8, str. 199-202.

1.3. Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Na osnovu dosadašnjeg rada i pokazanih rezultata tokom magistarskih studija Mr. Olivera Prodanović je pokazala smisao i sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. To se ogleda, pre svega, u potpuno samostalnom kreiranju i realizaciji istraživanja, kako vezanih za temu doktorske disertacije, tako i mnogo šire. Iz oblasti istraživanja, iz koje se predlaže tema doktorske disertacije, već je odbranila magistarski rad i objavila 5 radova u međunarodnim časopisima, dva rada u nacionalnim časopisima i saopštila 6 radova na međunarodnim i nacionalnim skupovima koji su štampani u celini.

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da Mr. Olivera Prodanović ispunjava sve potrebne uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

2. Predmet i cilj istraživanja

Interes za efikasnim enzimskim procesima u cilju uklanjanja fenola iz otpadnih voda, koji su zasnovani na principima zaštite energije i životne okoline je u stalnom porastu (Alemzadeh i Nejati, 2009). Pažnja je naročito usmerena na oksido-reduktaze, npr. peroksidaze, koje imaju veliki potencijal kao katalizatori u bioremedijaciji i prečišćavanju otpadnih voda. U toku prethodne tri decenije objavljen je veliki broj naučnih radova i patenata iz ove oblasti. Međutim, iako je postalo jasno da se radi o veoma perspektivnoj oblasti istraživanja, još uvek nisu postignuti odgovarajući kapaciteti proizvodnje zbog malih prostorno-vremenskih prinosa reaktora i male stabilnosti peroksidaze u prisustvu agresivnih hemikalija i samog supstrata (vodonik-peroksida). U cilju prevazilaženja ovih problema nastavljaju se istraživanja u pravcu stabilizacije peroksidaze imobilizacijom na različite nosače i drugim postupcima kao i u pravcu optimizacije procesnih uslova i konstrukcije bioreaktora.

Predmet rada ove doktorske disertacije je razvoj efikasnog imobilisanog sistema sa peroksidazom iz rena (EC 1.11.1.7; HRP) za reakcije polimerizacije i oksidacije fenola koje se mogu koristiti pri sintezi polimera i uklanjanju fenola iz otpadnih vode. Na osnovu uvida u literaturu uočava se da se kovalentnom imobilizacijom enzima na sintetske polimerne nosače sa epoksidnim grupama mogu dobiti veoma stabilni imobilisani sistemi sa velikim brojem enzima (Torres i Batista-Viera, 2012; Grazu i saradnici, 2012; Knežević i saradnici, 2006; Prlainović i saradnici, 2012). Međutim, objavljeno je svega nekoliko radova koji se odnose na kovalentnu imobilizaciju peroksidaze na polimernim nosačima sa epoksidnim grupama (Pramparo i saradnici, 2009). U ovom malu broju radova nije ispitan uticaj veličine čestica i morfologije nosača na aktivnost i stabilnost imobilisane peroksidaze, već je imobilizacija vršena na komercijalnom nosaču (Eupergit) sa jednom definisanom veličinom čestica i pora. U ovoj tezi razvijaće se dva tipa sistema sa imobilisanom peroksidazom,

jedan zasnovan na kovalentnom vezivanju HRP-a za makroporozni sintetski polimer, i drugi, zasnovan na inkapsulaciji HRP unutar alginatnih mikročestica. Za prvi tip imobilisane peroksidaze ispitivaće se dve serije makroporoznog kopolimera etilenglikoldimetakrilata i glicidilmetakrilata, jedna sa prečnikom mikročestica kopolimera od 150 do 300 μm , i druga serija, sa prečnikom od 2 do 3 μm . U okviru svake od serija koristiće se mikročestice kopolimera sa različitim prečnikom pora (od 50 do 200 nm) i različitim karakteristikama (morfologijom) površine. Takođe će biti ispitane i različite metode kovalentne imobilizacije peroksidaze za kopolimer, kao što su imobilizacija preko epoksidne grupe i glutaraldehida, kao i perjodatna metoda, koja se zasniva na prethodnoj oksidaciji ugljeno-hidratne frakcije enzima i imobilizaciji preko karbonilnih grupa. Kao drugi sistem imobilisane peroksidaze ispitaće se inkapsulirana HRP u mikročesticama alginata. U cilju poboljšanja efikasnosti imobilizacije biće ispitane različite hemijske modifikacije peroksidaze i polisaharidnih lanaca alginata aminima i fenolima.

Svi imobilisani sistemi biće upoređeni sa aspekta specifične aktivnosti imobilizata, procenta vezivanja i prinosa imobilizacije. Dobijeni imobilizati će takođe biti okarakterisani u pogledu na kinetičke konstante, pH optimum, termostabilnost i stabilnost u nepolarnim i polarnim organskim rastvaračima. Najbolji imobilizati će biti testirani u šaržnom i protočnom reaktoru u reakcijama oksidacije, tj. uklanjanja fenola tokom koje će im biti određena operativna stabilnost.

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je razvoj imobilisanih sistema sa peroksidazom iz rena u cilju dobijanja visoko aktivnog i stabilnog preparata imobilisane peroksidaze u reakciji oksidacije fenola. Ciljevi istraživanja obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom mogu se podeliti u nekoliko celina:

- 1) Izolacija i karakterizacija native peroksidaze iz rena kao i ispitivanje njenih katalitičkih svojstava u reakciji oksidacije fenola kao referentnom sistemu;
Ovo je potrebno da bi se utvrdile razlike u delovanju nativnog i imobilisanog enzima. U tom cilju utvrdiće se sadržaj proteina u enzimskom preparatu, specifična aktivnost, pH i temperaturni profil, termalna stabilnost kao i vrednosti kinetičkih konstanti i to Mihaelisove konstante, maksimalne brzine reakcije i konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m).
- 2) Izbor nosača i optimizacija metode za imobilizaciju peroksidaze iz rena u cilju dobijanja efikasnog biokatalizatora za izvođenje reakcije oksidacije fenola;
Ispitaće se nekoliko postupaka imobilizacije enzima na različitim prirodnim i sintetskim polimerima (alginat, nosintetisani i komercijalni polimeri na bazi polimetakrilata).
- 3) Utvrđivanje optimalnih procesnih parametara enzimskih reakcija i odgovarajućih kinetičkih parametara u realnim sistemima sa imobilisanim enzimom;
- 4) Izbor konfiguracije i operativnog režima rada bioreaktora, kao i načina izvođenja procesa (postepeno dodavanje vodonik-peroksida) za izvođenje reakcije oksidacije fenola;
- 5) Ispitivanje mogućnosti primene koimobilizacije dva enzima, glukozo-oksidge i peroksidaze, na prethodno odabranom sistemu u cilju povećanja stabilnosti imobilisanog sistema;

Na ovaj način se želi postići kontrolisano oslobađanje vodonik-peroksida kao proizvoda prve enzimske reakcije katalizovane glukozo-oksidgeom i kao supstrata u drugom enzimskom sistemu, tj. imobilisane peroksidaze.

- 6) Ispitivanje efikasnosti nekoliko odabranih imobilisanih enzimskih sistema na realnim supstratima kao što su industrijske otpadne vode.

Literatura:

1. Pramparo L., Stueber F., Font J., Fortuny A., Fabregat A., Bengoa C.: Immobilisation of horseradish peroxidase on Eupergit C for the enzymatic elimination of phenol, *Journal of Hazardous Materials*, Vol 177, 2009, pp. 990-1000.
2. Azevedo, A.M., Vojinovic V., Cabral J.M.S., Gibson T.D., Fonseca L.P.: Operational stability of immobilised horseradish peroxidase in mini-packed bed bioreactors, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol 28, 2004, pp. 121-128.
3. Monier M., Ayad D.M., Wei Y., Sarhan A.A.: Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol 46, 2010, pp. 324-330.
4. Alemzadeh I., Nejati S.: Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase, *Journal of Hazardous Materials*, Vol 166, 2009, pp. 1082-1086.
5. Velde F., Nidia D.L., Bakker M., Rantwijk F., Sheldon R.A.: Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase, Vol 69, No 3, 2000, pp. 286-291.
6. Le-Tien C., Millette M., Lacroix M., Mateescu M.A.: Modified alginate matrice for the immobilization of bioactive agents, Vol 38, 2004, pp. 1-10.
7. Dunand C., Tognolli M., Overney S., Tobel L., Meyer M., Simon P., Penel C.: Identification and characterisation of Ca^{2+} - pectate binding peroxidases in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Plant Physiology*, Vol 159, 2002, pp. 1165-1171.
8. Shukla P.S., Modi K., Ghosh P.K., Devi S.: Immobilization of Horseradish Peroxidase by Entrapment in Natural Polysaccharide, *Journal of Applied Polymers Science*, Vol. 91, 2004, pp. 2063-2071.
9. Isobe N., Lee D.S., Kwon Y.J., Kimura S., Kuga S., Wada M., Kim U.J.: Immobilization of protein on cellulose hydrogel, *Cellulose*, Vol 18, 2011, pp. 1251-1256.
10. Naves A.F., Carmona-Ribeiro A.M., Petri F.S.D.: Immobilized Horseradish Peroxidase as a reusable Catalyst for Emulsion Polymerization, *Langmuir*, Vol 23, 2007, pp. 1981-1987.
11. Gholami-Borujeni, F., Mahvi, A.H., Naseri, S., Faramarzi, M.A., Nabizadeh, R., Alimohammadi, M.: Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution, *Research Journal of Chemistry and Environment*, Vol 15, No 2, 2011, pp. 217-222.

12. Knežević, Z., Milosavić, N., Bezbradica, D., Jakovljević, Z., Prodanović, R.: Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, *Biochemical Engineering Journal*, Vol 30, No 3, pp. 269-278.
13. Prlainović, N.Ž., Knežević-Jugović, Z.D., Mijin, D.Ž., Bezbradica, D.I.: Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads®: The effect of lipase oxidation by periodates, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol 34, No 7, 2011, pp. 803-810.
14. Grazu, V., Lopez-Gallego, F., Guisan, J.M.: Tailor-made design of penicillin G acylase surface enables its site-directed immobilization and stabilization onto commercial mono-functional epoxy supports, *Process Biochemistry*, Vol 47, No 12, 2012, pp. 2538-2541.
15. Mohan, S. V., Prasad, K. K., Rao, N. C., Sarma, P. N.: Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*, Vol 5, No 8, 2005, pp. 1097-1105.
16. Hong, Y. J., Lee, M. S., Kim, J. C.: pH-dependent release of alginate beads coated with polylysine. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol 17, No 3, 2011, pp. 410-414.
17. Torres, P., Batista-Viera, F.: Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans* β -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol 83, 2012, pp. 57-64.

3. Polazne hipoteze

Sve veća primena enzima u hemijskoj industriji i zaštiti životne sredine i razvoj novih komercijalnih enzimskih procesa u svetu nedvosmisleno pokazuje da su enzimi biokatalizatori izuzetnih osobina i da u svetlu razvijanja novih tehnoloških postupaka baziranih na strogim principima vezanim za očuvanje životne sredine oni postaju nezamenljivi. Za ove procese su u razvijenim zemljama razvijeni različiti sistemi i postrojenja, veliki broj i do komercijalne primene. Na osnovu pregleda velikog broja radova i патената u ovoj oblasti može se zaključiti da se enzimi, naročito oksido-reduktaze, danas uspešno koriste kao katalizatori u bioremedijaciji i prečišćavanju otpadnih voda.

Peroksidaza iz rena (EC 1.11.1.7) katalizuje oksidaciju različitih organskih jedinjenja uključujući fenole, alifatične i aromatične amine, leuko boje, askorbinsku kiselinu, neke aminokiseline, nitrite i veliki broj drugih jedinjenja, pa može da ima veliki praktični značaj u razgradnji aromatičnih jedinjenja prisutnih u nafti, uklanjanju fenola iz otpadnih voda, razgradnji lepкова i drugih adheziva. Osnovni problem za primenu ovih enzimskih procesa u prečišćavanju sintetičkih otpadnih voda je mala operativna stabilnost peroksidaza u prisustvu sopstvenih supstrata i na povišenim temperaturama, zbog čega se

velika pažnja posvećuje imobilizaciji ovog enzima na različite nosače u cilju stabilizacije i recikliranja.

Osnovna hipoteza sa kojom se ulazi u istraživanja je da peroksidaza iz rena može u izvesnoj meri da polimerizuje fenole i druga aromatična jedinjenja i tako smanji njihovu koncentraciju u otpadnim vodama. Da bi se ovo postiglo, enzim mora biti dovoljno aktivan i stabilan u prisustvu velikog broja agresivnih hemijskih supstanci što će se nastojati postići u radu njegovom imobilizacijom na različite nosače. Kako je u radovima sa lipazama pokazano da se one mogu značajno stabilizovati kovalentnom imobilizacijom na različitim polimernim nosačima sa epoksidnim grupama (Grazu i saradnici, 2012; Knežević i saradnici, 2006), u ovom radu će se prvo ispitati mogućnost primene mikročestica kopolimera na bazi etilenglikoldimetakrilata i glicidilmetakrilata kao nosača za efikasnu imobilizaciju peroksidaze iz rena. Sledeća hipoteza je da će stabilnost biokatalizatora značajno zavisiti od načina vezivanja, ali i od veličine čestica i poroznosti nosača, tako da će se istraživanjima obuhvatiti ispitivanja stabilnosti imobilisane peroksidaze na dve serije polimernih mikročestica različite veličine (serija mikročestica kopolimera od 150 do 300 μm i druga serija sa prečnikom od 2 do 3 μm). U okviru svake od serija koristiće se kopolimeri sa različitim prečnikom pora (od 50 do 200 nm) i različitim karakteristikama (morfologijom) površine mikročestica. Takođe će biti ispitane i različite metode kovalentne imobilizacije peroksidaze za kopolimer.

U literaturi je pokazano na primeru drugih enzima da se inkapsulacijom enzima u polimerne matrice, koje su propustljive za supstrat i proizvode reakcije i ne propustljive za enzim, može postići njihova značajna stabilizacija od negativnih uticaja iz spoljašnje sredine. Za ove namene su naročito interesantni prirodni polisaharidi kao što su alginat, hitozan, pektin i drugi jer su netoksični i geliraju pod blagim uslovima. Na osnovu literaturnog pregleda može se zaključiti da su istraživanja vezana za inkapsulaciju peroksidaza u polimerne matrice nedovoljno zastupljena. Objavljeno je tek nekoliko radova baziranih na ispitivanju uslova imobilizacije na količinu i aktivnost inkapsulirane peroksidaze u alginatnim česticama. Međutim, pri tome je korišćena sad već standardna tehnika inkapsulacije, koja se zasniva na geliranju alginata u prisustvu enzima, kada se enzim mehanički inkorporira u gel (Gholami-Borujeni i saradnici, 2011). Zbog toga je imobilisani enzim pokazao malu stabilnost u realnom sistemu prilikom uklanjanja boje iz otpadnih voda tekstilne industrije jer je dolazilo do spiranja enzima iz alginatnih čestica. Jedna od važnih hipoteza u ovom radu je da će se inkapsulacijom peroksidaze iz rena u hemijski modifikovane alginatne mikročestice dobijene emulgacionim postupkom postići njihova dodatna stabilizacija, ali uz očuvanje aktivnosti enzima. Peroksidaza imobilisana unutar alginatnih mikročestica bila bi dodatno stabilizovana hemijskim vezivanjem za polimer što se može postići prethodnom hemijskom modifikacijom alginata aminima i fenolima. Kako se u ovim sistemima velika pažnja posvećuje problemu rešavanja difuzionih limitacija, pažnja će se posvetiti i ispitivanju različitih postupaka za dobijanje uniformnih alginatnih mikročestica sa malom raspodelom veličina kao što su emulgacioni postupak i elektrostatička ekstruzija. U literaturi se uglavnom koristi jednostavan postupak ukapavanja suspenzije alginata i enzima u rastvor kalcijum-hlorida pod uticajem samo gravitacionih sila, pa su dobijene čestice bile veće od 2-3 mm. Hipoteza sa kojom se ulazi u ova istraživanja je da će emulgacioni postupak i elektrostatička ekstruzija omogućiti dobijanje alginatnih čestica malih dimenzija i sa malom raspodelom veličine, čime bi se povećala kontaktna površina za vezivanje enzima i unapredio prenos

mase u ovim složenim heterogenim sistemima. Poređenjem najvažnijih parametara imobilizacije testiranih metoda i uzimajući u obzir njihove praktične prednosti i nedostatke, jedna od njih bi bila izabrana za dalji rad.

4. Naučne metode istraživanja

Za izolovanje, prečišćavanje i karakterizaciju peroksidaze iz rena koristiće se savremene biohemijske i instrumentalne metode, kao što su taloženje amonijum-sulfatom, frakciono ultracentrifugovanje i SDS-PAGE elektroforeza. Aktivnost peroksidaze će se određivati spektrofotometrijskom metodom na osnovu merenja količine nastalog proizvoda oksidacije pirogalola. Sadržaj proteina će se određivati standardnom spektrofotometrijskom metodom po Loriju (Lowry). Svi postupci hemijske modifikacije enzima i polimera će se izvoditi prema originalnim i modifikovanim metodama iz literature. U slučaju imobilizacije peroksidaze unutar alginatnih čestica primeniće se dve tehnike za dobijanje mikročestica i to emulgacioni postupak i elektrostatička ekstruzija. Dobijeni imobilisani enzimi biće okarakterisani prema standardnim metodama za određivanje termostabilnosti i operative stabilnosti, pH i temperaturnog profila, dok će se obrazovanje hemijskih veza tokom modifikacije enzima i nosača utvrditi FT-IR spektroskopijom, UV-spektrofotometrijskim metodama i kiselo baznom titracijom. Kinetika reakcije će biti ispitana u početnim uslovima (kada proreaguje manje od 10% početne količine supstrata), pri čemu će se za obradu rezultata koristiti klasični kinetički modeli jednosupstratnih i bisupstratnih enzimskih reakcija (Mihaelis-Mentenov model, ping-pong Bi Bi model).

5. Očekivani naučni doprinos

Očekuje se da će navedena istraživanja dati značajan naučni doprinos u razvoju novih metoda i novih materijala za imobilizaciju enzima kao i sagledavanju mogućnosti primene imobilisane peroksidaze u oksidaciji i polimerizaciji fenola i njihovom uklanjanju iz otpadnih voda.

Po završetku predloženih istraživanja mogu se očekivati sledeći naučni doprinosi:

- Izabraće se najefikasniji nosač i metoda za imobilizaciju peroksidaze i optimizovaće se postupak imobilizacije sa aspekta aktivnosti i stabilnosti imobilisanog enzima;
- Doprinos razumevanju uticaja veličine čestica i morfologije nosača na aktivnost i stabilnost imobilisane peroksidaze;
- Doprinos razumevanju difuzionih efekata u sistemima sa imobilisanom peroksidazom;
- Razvoj originalnog postupka za dobijanje hemijski modifikovanih alginatnih mikročestica uniformne veličine i raspodele veličine pora sa inkapsuliranom i hemijski vezanom peroksidazom;
- Razvoj efikasnog imobilisanog sistema sa peroksidazom za uklanjanje fenola iz otpadnih voda (izbor konfiguracije i operativnog režima rada bioreaktora, način dodavanja vodonik-peroksida u sistem);
- Utvrdiće se optimalni procesni parametri enzimskog procesa i odgovarajući kinetički parametri pri uklanjanju fenola iz realnih sistema (industrijske otpadne vode).

Pored ovog osnovnog naučnog doprinosa, rezultati koji će proisteći iz ove disertacije doprineće razvoju novih tehnika imobilizacije i imobilisanih sistema kao i dobijanja mikročestica, što može da bude od značaja i za razvoj imobilisanih sistema sa drugim enzimima.

6. Plan istraživanja i struktura rada

U toku rada na disertaciji predviđene su sledeće faze i aktivnosti u istraživanju:

1) Izolacija peroksidaze iz rena, njeno prečišćavanje i karakterizacija. Da bi se utvrdile razlike u delovanju nativnog i imobilisanog enzima i kvantitativno odredila efikasnost imobilisanih sistema, potrebno je u prvim fazama istraživanja izvršiti karakterizaciju nativne peroksidaze iz rena i ispitati njena katalitička svojstva u reakciji oksidacije fenola kao referentnom sistemu. U tom cilju početne aktivnosti se odnose na izolaciju i prečišćavanje enzima standardnim postupcima, utvrđivanje sadržaja proteina u prečišćenom enzimskom preparatu, određivanje specifične aktivnosti, pH i temperaturnog profila, termalne stabilnosti kao i vrednosti kinetičkih konstanti i to Mihaelisove konstante, maksimalne brzine reakcije i konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m).

2) Izbor sintetskog polimernog nosača za kovalentnu imobilizaciju peroksidaze iz rena i optimizacija uslova imobilizacije. U radu će biti ispitana dva polimera na bazi polimetakrilata koji sadrže epoksidne funkcionalne grupe i to kopolimer glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata (dve serije, jedna sa intervalom veličina čestica od 150 do 300 μm i druga serija, sa prečnikom od 2 do 3 μm) i komercijalni nosač, Eupergit C (veličina čestica $\approx 100 \mu m$). U cilju poboljšanja metode imobilizacije ispitaće se nekoliko postupaka imobilizacije enzima koji bi se zasnivali na direktnom hemijskom vezivanju enzima preko epoksidnih grupa nosača ili na prethodnoj modifikaciji nosača i/ili enzima. U tom smislu kopolimer će se prethodno tretirati etilendiaminom i glutaraldehidom čime bi se omogućilo uvođenje karbonilne grupe na nosač i na taj način vezivanje enzima preko amino grupa. Isto tako, imajući u vidu da je peroksidaza glikoprotein, u radu će se ispitati i mogućnost vezivanja prethodno oksidovanog enzima natrijum-perjodatom na amino-funkcionalizovan nosač u cilju dobijanja preparata velike aktivnosti jer bi ova metoda omogućila vezivanje enzima preko neproteinske, ugljenohidratne komponente, koja ne učestvuje u katalizi. Ovako dobijeni glikozilovani enzim sada može da se veže za amino-nosače preko uvedenih karbonilnih grupa koje nisu od esencijalnog značaja za njegovu aktivnost. Očekuje se, takođe, da će ova metoda značajno doprineti stabilizaciji enzima jer su i u prirodi najstabilniji enzimi glikoproteini i enzimi se obično produkuju u glikozilovanom obliku u slučaju kada ih ćelija produkuje u spoljašnju sredinu, gde su nepovoljniji uslovi. Navedena metoda se pokazala kao veoma efikasna u slučaju imobilizacije lipaze na epoksidne nosače (Knežević i saradnici, 2006; Prlainović i saradnici, 2011).

3) Unapređenje metode imobilizacije peroksidaze iz rena u alginatne čestice. Na osnovu uvida u literaturu osnovni problem koji se javlja pri imobilizaciji malog molekula enzima, kao što je peroksidaza, u alginatni gel je spiranje enzima iz polimerne matrice i difuzione limitacije pri izvođenju reakcije sa imobilisanim enzimom (Mohan i saradnici, 2005). U literaturi je opisano nekoliko načina da se poveća stabilnost imobilisane peroksidaze u alginatne čestice kao što su oblaganje alginatnih čestica polikatjonskom membranom od poli L-lizina i/ili hitozana (Hong i saradnici, 2011). Aktivnosti u toku rada na ovoj disertaciji će se usmeriti na ispitivanje mogućnosti modifikacije polisaharidnih lanaca alginata fenolnim i amino jedinjenjima u cilju dobijanja novih reaktivnih grupa u

molekulu alginata, koje bi obezbedile kovalentno vezivanje peroksidaze tokom njene inkapsulacije unutar čestica alginata i time poboljšali stabilnost imobilizovanog enzima i prinos imobilizacije. Aktivnosti će se usmeriti i na optimizaciju postupka za dobijanje alginatnih mikročestica jer se time može unaprediti prenos mase i povećati efikasnost procesa sa imobilisanim enzimom.

4) Karakterizacija i poređenje dobijenih imobilisanih peroksidaza u reakciji oksidacije fenola kao referentnom sistemu. Svi imobilisani sistemi biće upoređeni sa aspekta specifične aktivnosti imobilizata, procenta vezivanja i prinosa imobilizacije. Dobijeni imobilizati će takođe biti okarakterisani u pogledu na kinetičke konstante, pH optimum, termostabilnost i stabilnost u nepolarnim i polarnim organskim rastvaračima. Najbolji imobilizati će biti testirani u šaržnom reaktoru u reakcijama oksidacije, tj. uklanjanja fenola tokom koje će im biti određena i operativna stabilnost.

5) Optimizacija procesnih parametara sa nekoliko odabranih imobilisanih peroksidaza u realnom sistemu. Ova faza podrazumeva aktivnosti usmerene na izbor temperature, pH, količine imobilisanog enzima, konfiguracije i operativnog režima rada reaktora, načina i dinamike uvođenja vodonik-peroksida u reaktor (postepeno dodavanje).

Predviđa se da će u doktorskoj disertaciji biti obrađena sledeće oblasti poglavlja: Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura. Struktura rada je sledeća:

U poglavlju *Uvod* biće prikazan kratak osvrt na oblast istraživanja i definisani glavni ciljevi disertacije i predmet istraživanja.

Poglavlje *Teorijski deo* obuhvatiće pregled dosadašnjih istraživanja koji se odnose na:

1. Strukturu i kinetičke osobine biljnih peroksidaza sa osvrtom na peroksidazu iz rena
2. Primenu peroksidaza u biotehnologiji i zaštiti životne sredine za sintezu i uklanjanje aromatičnih jedinjenja i fenola iz otpadnih voda
3. Imobilizacija peroksidaze na makroporoznim kopolimerima
4. Kovalentna imobilizacija enzima
5. Imobilizacija peroksidaze inkapsulacijom u alginatu
6. Hemijske modifikacije peroksidaze
7. Hemijske modifikacije alginata

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

1. Izolovanje i prečišćavanje peroksidaze iz rena
2. Određivanje čistoće peroksidaze metodom SDS-PAGE-elektroforeze
3. Karakterizacija peroksidaze iz rena i određivanje biohemijskih i kinetičkih svojstava
4. Kovalentna imobilizacija peroksidaze na makroporoznom kopolimeru
5. Hemijska modifikacija peroksidaze
6. Hemijska modifikacija alginata
7. Imobilizacija peroksidaze inkapsulacijom u alginatu

8. Merenje aktivnosti slobodne i imobilizovane peroksidaze
9. Određivanje pH optimuma slobodne i imobilizovane peroksidaze
10. Određivanje termostabilnosti slobodne i imobilizovane peroksidaze
11. Određivanje stabilnosti u organskom rastvaraču slobodne i imobilizovane peroksidaze
12. Određivanje kinetičkih parametara: Mihaelisove konstante, K_m i maksimalne brzine reakcije, v_m slobodne i imobilisanih peroksidaza
13. Izvođenje reakcije oksidacije fenola u šaržnom reaktoru sa imobilisanim peroksidazama i određivanje operativne stabilnosti
14. Izvođenje reakcije oksidacije fenola u protočnim reaktorima sa odabranom imobilisanom peroksidazom i optimizacija procesa.

U poglavlju *Rezultati i diskusija* biće prikazani i diskutovani dobijeni rezultati. Ovo poglavlje sadržiće prikaz i diskusiju sledećih eksperimenata:

1. Svojstva makroporoznog kopolimera etilenglikoldimetakrilata i glicidilmetakrilata
2. Uticaj veličine pora kopolimera na parametre imobilizacije peroksidaze (aktivnost, stabilnost i prinos imobilizacije)
3. Uticaj veličine čestica kopolimera na parametre imobilizacije peroksidaze (aktivnost, stabilnost i prinos imobilizacije)
4. Uticaj metode kovalentne imobilizacije na parametre imobilizacije peroksidaze
5. Uticaj količine nanetog enzima na aktivnost imobilizata i prinos imobilizacije
6. Uticaj metode hemijske modifikacije peroksidaze na aktivnost, stabilnost i prinos inkapsulacije peroksidaze u alginatnim mikročesticama
7. Uticaj hemijske modifikacije alginata na aktivnost, stabilnost i prinos inkapsulacije peroksidaze u alginatne mikročestice
8. Operativna stabilnost različitih imobilizata peroksidaze u šaržnom i protočnom reaktoru u reakciji polimerizacije fenola
9. Optimizacija načina dodavanja i količine vodonik-peroksida i procesnih parametara u šaržnom i protočnom reaktoru u reakciji polimerizacije fenola imobilisanom peroksidazom

U *Zaključku* će biti sumirani dobijeni rezultati i izvedeni zaključci na osnovu upoređivanja sa literaturnim podacima.

U delu *Literatura* biće navedene reference citirane u disertaciji, uključujući i naučne publikacije proistekle iz istraživanja u okviru ovde disertacije.

7. Zaključak i predlog

Na osnovu svega izloženog, Komisija smatra da je predložena tema doktorske disertacije Mr. Olivera Prodanović pod naslovom **“RAZVOJ IMOBILISANIH SISTEMA PEROKSIDAZE IZ RENA *Amoracia rusticana* ZA POLIMERIZACIONE REAKCIJE I UKLANJANJE FENOLA IZ OTPADNIH VODA”** naučno zasnovana, pa

predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko–metalurškog fakulteta da je prihvati. Za mentora se predlaže dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Istraživanja u okviru ove disertacije pripadaju naučnoj oblasti Hemija i hemijska tehnologija za koju je Tehnološko-metalurški fakultet, Univerziteta u Beogradu, matična ustanova.

U Beogradu, 18.02.2013. godine

ČLANOVI KOMISIJE

dr Zorica Knežević-Jugović, van. prof TMF Univerziteta u Beogradu

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik, Institut za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu

dr Dejan Bezbradica, docent TMF Univerziteta u Beogradu

dr Dušan Mijin, redovni prof. TMF Univerziteta u Beogradu