

TEHNOLOŠKO-METALURŠKI
FAKULTET

35/275
(Broj zahteva)

30.09.2013.
(Datum)

UNIVERZITET U BEOGRADU

Veće naučnih oblasti tehničkih nauka
(Naziv veća naučne oblasti i kome se
zahtev upućuje)

Z A H T E V
za davanje saglasnosti na predlog teme doktorske disertacije

Molimo da, shodno članu 46. st. 5. tačl. 3 Statuta Univerziteta u Beogradu („Glasnik Univerziteta“, broj 131/06), date saglasnost na predlog teme doktorske disertacije:

**„PROIZVODNJA MIKROBNIH LIPAZA I PROTEAZA KAO ADITIVA U FORMULACIJAMA
DETERGENATA“**

(pun naziv predložene teme doktorske disertacije)

NAUČNA OBLAST: TEHNOLOŠKO INŽENJERSTVO

PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog od roditelja i prezime kandidata:

SANJA (Željko) GRBAVČIĆ

2. Naziv i sedište fakulteta na kome je stekao visoko obrazovanje: Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet

3. Godina diplomiranja: 2006.

4. Naziv magistarske teze kandidata:

Školske 2007/2008. godine, Odlukom Nastavno-naučnog veća Fakulteta, prešla je sa magistarskih na doktorske studije.

5. Naziv fakulteta na kome je magistarska teza odbranjena: /

6. Godina odbrane magistarske teze: /

Obaveštavamo Vas da je Nastavno-naučno veće,

(naziv nadležnog tela Fakulteta)

na sednici održanoj 26.09.2013. godine razmotrilo predloženu temu i zaključilo da je tema podobna za izradu doktorske disertacije.

DEKAN FAKULTETA

Prof. dr Đorđe Janačković

Prilog: 1. Predlog teme doktorske disertacije sa obrazloženjem

2. Akt nadležnog tela fakulteta o podobnosti teme za izradu doktorske disertacije

3. Podaci o mentoru.

Na osnovu čl. 30. stav 3. Zakona o visokom obrazovanju, čl. 76. stav 3. Statuta TMF-a i čl. 29. Pravilnika o doktorskim studijama TMF, na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta od 26.09.2013. godine, doneta je

O D L U K A

*o prihvatanju Izveštaja Komisije za ocenu naučne zasnovanosti
teme i odobrenju izrade doktorske disertacije*

Prihvata se Izveštaj Komisije za ocenu naučne zasnovanosti predložene teme i odobrava izrada *doktorske disertacije* **SANJE GRBAVČIĆ, dipl. inž.**, pod nazivom: „**PROIZVODNJA MIKROBNIH LIPAZA I PROTEAZA KAO ADITIVA U FORMULACIJAMA DETERGENATA**“, uz uslov da Veće naučnih oblasti Univerziteta u Beogradu da saglasnost na predlog teme.

Za mentora se određuje dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor TMF.

Odluku dostaviti: Veću naučnih oblasti na saglasnost, kandidatu, mentoru, Službi za nastavno studentske poslove i arhivi Fakulteta.

D E K A N

Prof. dr Đorđe Janačković

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата Сању Грбавчић, дипл. инж технологије

Име и презиме ментора: Зорица Кнежевић-Југовић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. S. Grbavčić, D. Bezbradica, L. Izrael-Živković, N. Avramović, N. Milosavić, I. Karadžić, Z. Knežević-Jugović, Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance, *Bioresource Technology*, **102(24)** (2011) 11226-11233. (ISSN: 0960-8524; IF(2011) 4,980; 20/158 Biotechnology & Applied Microbiology).
2. Z. Knežević, N. Milosavić, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, R. Prodanović, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, *Biochemical Engineering Journal*, **30(3)** (2006) 269-278. (ISSN: 1369-703X; IF(2007) 1,872; 14/114 Engineering, Chemical).
3. O. Moftah, S. Grbavčić, M. Žuža, N. Luković, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, Adding value to the oil 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(2)** (2012) 348-364. (ISSN: 0273-2289; IF(2010) 1,879; 79/160 Biotechnology & Applied Microbiology).
4. S. Ž. Grbavčić, S. I. Dimitrijević-Branković, D. I. Bezbradica, S. S. Šiler-Marinković, Z. D. Knežević, Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*, *J. Serb. Chem. Soc.*, **72(8-9)** (2007) 757-765. (ISSN: 0352-5139; IF(2008) 0,611; 91/127 Chemistry, Multidisciplinary).
5. A. Smelcerović, Z. Knežević-Jugović, Ž. Petronijević, Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals, Review paper, *Current Pharmaceutical Design*, **14(29)** (2008) 3168-3195. (ISSN: 1381-6128; IF(2006) 5,270; 17/199 Pharmacology & Pharmacy).

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничкотехнолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог

универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 29.09.2013

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

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

Predmet: Podobnost teme i kandidata Sanje Grbavčić za izradu doktorske disertacije

Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 27.06.2013. godine, imenovani smo za članove Komisije za ocenu naučne zasnovanosti teme doktorske disertacije pod naslovom:

„Proizvodnja mikrobni lipaza i proteaza kao aditiva u formulacijama detergenata“

koju je predložila Sanja Grbavčić, dipl. inženjer tehnologije. Na osnovu materijala priloženog uz Zahtev kandidata, Komisija Nastavno–naučnom veću podnosi sledeći

IZVEŠTAJ

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografija kandidata

Sanja Ž. Grbavčić je rođena 26.09.1980. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu i V beogradsku gimnaziju. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu započela je školske 1999/2000. godine, a diplomirala na smeru Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija 2006. godine sa prosečnom ocenom 8,11. Diplomski rad pod nazivom "Optimizacija postupka produkcije lipaza pomoću kvasaca" odbranila je sa ocenom 10,00.

Školske 2006. god. upisala je magistarske studije na Katedri biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta. Odlukom Nastavno-naučnog veća održanog 07.02.2008. prelazi sa magistarskih na doktorske studije Tehnološko-metalurškog fakulteta na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija, uključujući i završni ispit sa prosečnom ocenom 10,00.

Položeni ispiti i ostvareni bodovi u toku doktorskih studija		Ocena	ESPB
1.	Matematička obrada eksperimentalnih podataka	10	5
2.	Sanitarna mikrobiologija	10	4
3.	Odabrana poglavlja biohemije-vitamini	10	5
4.	Hemijska kinetika	10	5
5.	Biohemijska kinetika	10	5
6.	Industrijska mikrobiologija	10	5
7.	Strukturna analiza organskih molekula	10	5
8.	Imobilisani sistemi u biotehnologiji	10	4
9.	Bioreaktorski sistemi sa imobilisanim biokatalizatorima	10	5
10.	Bioaktivne materije u kozmetičkim proizvodima	10	4

11. Biomasa kao izvor energije	10	4
12. Završni ispit	10	30

Od juna 2006. godine Sanja Grbavčić je kao istraživač-pripravnik bila zaposlena na projektu BTH1008- „Dodaci hrani dobijeni biotehničkim putem“ koji je u periodu 2004-2007 godine finansiralo Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije u okviru „Nacionalnog programa biotehnologije i agroindustrije“. Od aprila 2008. je zaposlena na projektu tehnološkog razvoja TR 20064- „Razvoj biotehničkih postupaka za proizvodnju aditiva i novih formulacija za prehrambenu industriju“ koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Zvanje istraživača saradnika stiče 2009. godine.

Od 01.01.2011. godine je zaposlena kao istraživač saradnik u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. III 46010 pod nazivom "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti".

Čita, piše i govori engleski i francuski jezik.

1.2. Stečeno naučnoistraživačko iskustvo

Nacionalni projekti:

1. „Dodaci hrani dobijeni biotehničkim putem“, Projekat bth1008, Nacionalni program novih tehnologija u prehrambenoj industriji Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije, 2005-2008.
2. „Razvoj biotehničkih postupaka za proizvodnju aditiva i novih formulacija za prehrambenu industriju“, Projekat u okviru programa za tehnološki razvoj TR 20064, MNTRS, 2008-2010.
3. „Razvoj novih enzimskih tehnologija za proizvodnju biološki aktivnih komponenata hrane“ potprojekat u okviru projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti", III 46010, Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije 2011-2014.

Iz rezultata dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada kandidata proizašlo je 7 (sedam) radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja (oznaka grupe M20: 1 rad M21, 1 rad M22, 5 radova M23), 5 (pet) radova objavljenih u zbornicima skupova međunarodnog značaja štampana u celini (5 radova M33), 12 (dvanaest) radova objavljenih u zbornicima skupova nacionalnog značaja (12 radova M63) i jednog tehničkog rešenja (novi tehnološki postupak M83).

Objavljeni naučni i stručni radovi i saopštenja na skupovima:

M 21 – rad u vrhunskom časopisu međunarodnog značaja

1. S. Grbavčić, D. Bezbradica, L. Izrael-Živković, N. Avramović, N. Milosavić, I. Karadžić, Z. Knežević-Jugović, Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with

detergent ingredients and washing performance, *Bioresource Technology*, 2011, 102 (24), 11226–11233. ISSN: 0960-8524; IF(2011) 4,980; 20/158 *Biotechnology & Applied Microbiology*).

M 22 – rad u istaknutom časopisu međunarodnog značaja

1. O.A.S. Moftah, **S. Grbavčić**, M. Žuža, N. Luković, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, Adding Value to the Oil Cake as a Waste from Oil Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation“, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166 (2), 348-364. (ISSN: 0273-2289; IF(2010) 1,879; 79/160 *Biotechnology & Applied Microbiology*).

M 23 – radovi u časopisima međunarodnog značaja

1. **S.Ž. Grbavčić**, S.I. Dimitrijević-Branković, D.I. Bezbradica, S.S. Šiler-Marinković, Z.D. Knežević, Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*, *Journal of Serbian Chemical Society*, 2007, 72 (8-9), 757-765. (ISSN: 0352-5139; IF(2008) 0,611; 91/127 *Chemistry, Multidisciplinary*).

2. **S.Ž. Grbavčić**, D.I. Bezbradica, I.M. Karadžić, Z. D. Knežević-Jugović, Lipaze i proteaze dobijene iz ekstremofilne *Pseudomonas aeruginosa* vrste kao aditivi u formulacijama deterdženata, *Hemijska industrija*, 2009, 63 (4), 331–335. (ISSN: 0367-598X; IF(2010) 0,137; 123/135 *Engineering, Chemical*).

3. M.R. Bradić, N.D. Ognjanović, D.I. Bezbradica, **S.Ž. Grbavčić**, N. Avramović, D.Ž. Mijin, Z.D. Knežević-Jugović, Enzimaska sinteza monoacilglicerola, *Hemijska Industrija*, 2010, 64 (5), 375-388. (ISSN: 0367-598X; IF(2011) 0,205; 120/133 *Engineering, Chemical*).

4. O.A.S. Moftah, **S.Ž. Grbavčić**, W.A.S. Moftah, N.D. Luković, O.L. Prodanović, S.M. Jakovetić, Z.D. Knežević-Jugović, Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates, *Journal of Serbian Chemical Society*, 2013, 78 (6), 781-794. (ISSN: 0352-5139; IF(2012) 0,912; 100/152 *Chemistry, Multidisciplinary*).

5. S.M. Jakovetić, Z.D. Knežević-Jugović, **S.Ž. Grbavčić**, D.I. Bezbradica, N.S. Avramović, I.M. Karadžić, Rhamnolipid and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* san-ai: The process comparison analysis by statistical approach, *Hemijska industrija*, 2013, 67 (4), 677-685 (ISSN: 0367-598X; IF(2012) 0,463; 104/133 *Engineering, Chemical*).

M 33 – radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u celosti

1. **Grbavčić Sanja**, Dimitrijević-Branković Suzana I., Bezbradica Dejan, Šiler-Marinković Slavica S., Knežević Zorica, „Optimization of growth medium composition for lipase production by *Candida utilis* using response surface methodology, 35th conference of Slovak Society of Chemical Engineering, ISBN: 978-80-227-2903-1, High Tatras, Slovakia, 26-30 maj 2008.

2. **Grbavčić Sanja**, Bezbradica Dejan, Izrael-Živković Lidija, Avramović Nataša, Milosavić Nenad, Karadžić Ivanka, Knežević-Jugović Zorica, „Lipase from *Pseudomonas*

aeruginosa as an additive in detergent formulations”, 36th conference of Slovak Society of Chemical Engineering, ISBN 978-80-227-3072-3, High Tatras, Slovakia, 25 - 29 maj 2009.

3. Jakovetić Sonja, Bezbradica Dejan, Avramović Nataša, Milosavić Nenad, **Grbavčić Sanja**, Karadžić Ivanka, Knežević-Jugović Zorica, „Optimization of rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology, 36th conference of Slovak Society of Chemical Engineering, ISBN 978-80-227-3072-3, High Tatras, Slovakia, 25 - 29 maj 2009.

4. **Sanja Grbavčić**, Nevena Ognjanović, Milena Žuža, Omar Ali Saied Moftah, Dejan Bezbradica, Zorica 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.

5. Zorica D. Knežević-Jugović, Sonja M. Jakovetić, Branimir Z. Jugović, Milica M. Gvozdenović, **Sanja Ž. Grbavčić**, Dejan I. Bezbradica, Mirjana G. Antov, „Enzymatic Synthesis of Aliphatic Esters of Phenolic Acids and Evaluation of Their Antioxidant Properties“, 39th conference of Slovak Society of Chemical Engineering, ISBN: 978-80-89475-04-9, High Tatras, Slovakia, 21-25 maj 2012.

M 63 - radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u celosti

1. **Sanja Ž. Grbavčić**, Suzana I. Dimitrijević-Branković, Dejan I. Bezbradica, Slavica S. Šiler-Marinković, Zorica D. Knežević, “Optimization of growth medium composition for lipase production by *Candida utilis*”, 45. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 25. i 26. januar 2007.

2. **Sanja Ž. Grbavčić**, Suzana I. Dimitrijević-Branković, Dejan I. Bezbradica, Slavica S. Šiler-Marinković, Zorica D. Knežević, “Uticaj sastava fermentacione podloge na prinos produkovanih lipaza pomoću kvasca *Candida utilis*”, VII simpozijum ”Savremena tehnologija i privredni razvoj”, Tehnološki fakultet, Leskovac, 19. i 20. oktobar 2007.

3. **Sanja Ž. Grbavčić**, Lidija Izrael-Živković, Dejan I. Bezbradica, Ivanka Karadžić, Slavica S. Šiler-Marinković, Zorica D. Knežević, “Uticaj sastava fermentacione podloge na prinos produkovanih lipaza pomoću *Pseudomonas aeruginosa* san-ai”, 46. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, 21. februar 2008.

4. Dejan Bezbradica, Sonja Jakovetić, **Sanja Grbavčić**, Nataša Avramović, Nenad Milosavić, Zorica Knežević-Jugović, Ivanka Karadžić, “Optimizacija proizvodnje biosurfaktanata pomoću *Pseudomonas aeruginosa*”, 47. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 21. mart 2009.

5. **Sanja Ž. Grbavčić**, Milena R. Bradić, Dejan I. Bezbradica, Nataša S. Avramović, Ivanka M. Karadžić, Zorica D. Knežević-Jugović, “Sinteza aroma estara lipazom iz *Pseudomonas*

aeruginosa san-ai”, 48. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 17. i 18. april 2010.

6. **Sanja Grbavčić**, Omar Ali Saied, Jelena Jovanović, Nevena Luković, Milena Žuža, Dejan Bezbradica, Zorica Knežević-Jugović, “Proizvodnja lipaza i proteaza iz *Candida utilis* tehnikom gajenja na čvrstoj podlozi”, Konferencija Biotehnologija za održivi razvoj, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 24-26. Novembar 2010.

7. Nevena D. Luković, **Sanja Ž. Grbavčić**, Milena G. Žuža, Zorica D. Knežević-Jugović, Dejan I. Bezbradica, „Primena modifikacije nosača Eupergit® C 250L cisteinom i glutaraldehidom u imobilizaciji lipaze iz *C. rugosa*“, Konferencija Biotehnologija za održivi razvoj, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 24-26. Novembar 2010.

8. Zorica D. Knežević-Jugović, Branimir Z. Jugović, Dejan I. Bezbradica, Milena G. Žuža, **Sanja Ž. Grbavčić**, Milica M. Gvozdenović, “Imobilizacija glukoza-oksidge na elektroprovodne polimere na bazi polianilina i razvoj biosenzora”, Konferencija Biotehnologija za održivi razvoj, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 24-26. Novembar 2010.

9. Sonja Jakovetić, Dejan Bezbradica, Nataša Avramović, Nenad Milosavić, **Sanja Grbavčić**, Ivanka Karadžić, Zorica Knežević-Jugović, „Kinetika produkcije ramnolipida iz *P. aeruginosa* san-ai“, Konferencija Biotehnologija za održivi razvoj, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 24-26. Novembar 2010.

10. Omar Ali Saied, **Sanja Grbavčić**, Nevena 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“, 49. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 21. mart 2009.

11. Sonja Jakovetić, Milica Carević, **Sanja Grbavčić**, Marija Stojanović, Nevena Luković, Milena Žuža, Mladen Mihailović, "Esterification of phenolic acid catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*", Prva konferencija mladih hemičara Srbije, 19. i 20. oktobra 2012, Beograd, XC ΠΟ5, 54-57

12. Vladimir Paunović, **Sanja Grbavčić**, „Ispitivanje mogućnosti primene mikroemulzija i mikroemulzija sa inkorporiranim lipazama kao detergenata za uklanjanje fleka trigliceridnog porekla“, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, 19. i 20. oktobra 2012, Beograd

M 83 - novo laboratorijsko postrojenje, novo eksperimentalno postrojenje, novi tehnološki postupak

1. D. Mijin, D. Bezbradica, S. Grbavčić, R. Pjanović, N. Bošković-Vragolović, Z. Knežević-Jugović, „Biotehnološki postupak za dobijanje geranil-butirata primenom imobilisane lipaze“,

Početak primene: 26.03.2009. Realizatori rezultata: Dahlia d.o.o.; Batajnički drum 12, Zemun.

Nagrade i priznanja:

1. S. Grbavčić, N. Avramović, D. Bezbradica, N. Milosavić, D. Mijin, I. Karadžić, Z. Knežević-Jugović, Srebrna medalja za nove tehnologije za: „Enzimaska formulacija za čišćenje tkanina, radnih površina i opreme u prehrambenoj industriji“, 30. Međunarodna izložba pronalazaka, novih tehnologija i industrijskog dizajna „Pronalazaštvo, Beograd, 2010“.

1.3. 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 prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Sanja Grbavčić, dipl. inženjer tehnologije, pokazala je interes, sklonost i sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Posebno je pokazala veliku sklonost za eksperimentalni rad tako da je samostalno uvela u proceduru nekoliko novih laboratorijskih postupaka vezanih za identifikaciju producenata lipolitičke aktivnosti, kao i izolovanje i prečišćavanje enzima. Tema doktorske disertacije pripada oblasti iz koje je do sada objavila četiri naučna rada, kao i više saopštenja na međunarodnim skupovima.

Na osnovu dosadašnje saradnje sa kandidatom kao i objavljenih naučnih radova, Komisija smatra da kandidat ispunjava sve potrebne uslove za rad na predloženoj temi.

2. Predmet i cilj istraživanja

Sve veće potrebe za novim proizvodima koji se mogu dobiti enzimskim putem zahtevaju pronalaženje novih biokatalizatora sa tačno određenim karakteristikama za specifične procese. Trenutno, velika većina komercijalno korišćenih enzima su ekstracelularni enzimi dobijeni pomoću različitih bakterijskih ili drugih mikrobnih vrsta. Raznovrsnost prirodnih oblika omogućava da se odabere mikroorganizam koji produkuje enzim sa tačno određenim svojstvima za datu namenu i u zadovoljavajućem prinosu.

Iako se određena svojstva enzima u skladu sa namenom mogu dobiti različitim metodama genetskog inženjeringa, još uvek je aktuelno u savremenim istraživanjima pronalaženje novih enzima sa specifičnim svojstvima koje produkuju mikroorganizmi izolovani iz njihovih prirodnih staništa. Međutim, ovo je veoma zametan posao jer je potrebno testirati veliki broj mikroorganizama na efikasnost proizvodnje određenog enzima, a zatim, i ispitati njihova svojstva od značaja za datu namenu. Posebnu pažnju privlače enzimi dobijeni pomoću ekstremofilnih mikroorganizama, budući da ti enzimi prirodno (*per se*) imaju niz posebnih svojstava, a pre svega izrazitu stabilnost, bez ikakvih dodatnih modifikacija (genetskih modifikacija soja ili hemijskih modifikacija enzima).

Primena enzima u industriji detergenata predstavlja najznačajniju komercijalnu primenu enzima danas sa preko 30% udela u ukupnoj vrednosti proizvoda dobijenih enzimskim putem. Zabrinutost zbog nerazgradivosti hemijskih komponenti detergenata i njihovog zagađenja podzemnih voda i izvora, kao i pitanja u vezi sa njihovim uticajem na

ljudsko zdravlje, delovala su kao podsticaj razvoja ekoloških detergenata koji sadrže enzime kao osnovne aktivne komponente. Enzimi deluju na specifične nečistoće koje je teško otkloniti pri blagim uslovima pranja. Međutim, nisu svi enzimi koji imaju sposobnost uklanjanja različitih tipova onečišćenja podesni za upotrebu kao aditivi u detergentima. Enzimi koji se koriste u formulacijama detergenata moraju da budu stabilni u prisustvu agenasa koji često imaju inhibitorno ili dezaktivirajuće dejstvo. Takođe, proces pranja se često vrši pri povišenim temperaturama (iznad 40 °C) i u izrazito alkalnoj sredini (pH 9–12). Pored toga, njihova proizvodnja mora biti ekonomična i poželjno je da isti proizvodni mikroorganizam istovremeno produkuje stabilne proteaze i lipaze koje inače predstavljaju dva osnovna aktivna sastojka u enzimskim formulacijama detergenata.

Predmet rada ove doktorske disertacije je proizvodnja lipaza i proteaza pomoću različitih mikroorganizama i ispitivanje njihovih karakteristika sa stanovišta njihove potencijalne primene u industriji detergenata.

Lipaze su jedna od najvažnijih klasa hidrolitičkih enzima koji katalizuju hidrolizu, kao i sintezu velikog broja estara karboksilnih kiselina. Veliki broj reakcija koje katalizuju, i to uglavnom uz visoku regio- i enantioselektivnost, čini ih izuzetno važnim biokatalizatorima u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Ipak, visoka cena proizvodnje lipaza često je razlog njihove ograničene industrijske primene. Kako svaka eventualna industrijska primena zahteva korišćenje lipaza tačno određenih karakteristika, na osnovu pokazanih svojstava dobijeni enzimi biće ispitani sa aspekta eventualne industrijske primene, gde će se posebna pažnja posvetiti primeni dobijenih enzima kao aditiva u industriji detergenata.

Funkcija lipaza u detergentima je razlaganje masnih mrlja na hidrofilnija jedinjenja koja se pri alkalnim uslovima koji vladaju u procesu pranja lako uklanjaju. Na taj način, omogućava se ekonomičniji postupak pranja, smanjuje se negativan uticaj agresivnih supstanci u procesu čišćenja kao i zagađivanje životne sredine, a sam proces pranja se može izvoditi na nižim temperaturama smanjujući potrošnju energije.

Prvi komercijalni lipolitički preparat namenjen primeni u detergentima-Lipolase, dobijen je tehnikom genetskog inženjeringa kako bi se enzim proizveo u dovoljnim količinama i kako bi njegovo korišćenje bilo ekonomski opravdano. Ovaj enzim je prirodno izolovan iz *Thermomyces lanuginosus* (stari naziv *Humicola lanuginosa*), dok je tehnikom rekombinacije gena izvršena njegova ekspresija u domaćinu *Aspergillus oryzae*. Ovaj preparat razvio je Novo Nordisk 1987. godine, a vodeći svetski proizvođači detergenata 90-tih godina počinju njegovo korišćenje u većoj meri. Istovremeno počinje i intenzivni razvoj istraživanja sa ciljem pronalaženja novih lipaza boljih svojstava za upotrebu u detergentima.

Pored lipaza, detergentima se kao aditivi dodaju i drugi hidrolitički enzimi i to proteaze, amilaze i celulaze. Proteaze se dodaju detergentima radi pospešenog uklanjanja mrlja na bazi proteina kao što su krv i neki tipovi hrane. Komercijalno korišćeni enzimi ove grupe su serinske proteaze dobijene iz različitih *Bacillus* vrsta. Primera radi, Novo Industri A/S proizvodi komercijalne enzimske preparate Alcalase[®] i Esperase[®] iz *Bacillus licheniformis* vrste i Savinase[®] iz alkalofilne *Bacillus amyloliquefaciens* vrste. Gist-Brocades je proizvođač enzinskog preparata Maxatase[®] (*Bacillus licheniformis*). Kako su proteaze najviše korišćeni enzimi u industriji detergenata, usled njihovog dejstva može doći do dezaktivacije drugih enzima prisutnih u formulaciji detergenta. Zbog toga je za uspešnu

inkorporaciju drugih tipova enzima u formulaciju koja sadrži proteaze potrebno selektovati enzime manje podložne proteolizi i preduzeti različite mere njihove zaštite.

Razvoj proizvodnje enzima za primenu u detergentima odvija se u dva pravca i postoji veliki broj publikacija koje opisuju nove enzime poboljšanih svojstava za primenu u detergentima (enzimi koji su aktivni na nižim temperaturama, u prisustvu većeg broja agresivnih supstanci-posebno u prisustvu oksidujućih materija, enzimi koji su manje podložni proteolizi, enzimi koji pokazuju veliku aktivnost već u prvom ciklusu pranja i dr.). Jedan od načina podrazumeva razvoj rekombinantnih enzima čija se svojstva prilagođavaju potrebama procesa pranja. Ipak, kako najveći broj prirodnih oblika mikrobnih enzima još uvek nije ispitan, testiranje velikog broja (tzv. *skringing*) mikroorganizama i ispitivanje svojstava enzima koje proizvode je i dalje jedan od osnovnih načina pronalaženja enzima za određenu namenu.

U ovom radu će se izvršiti ispitivanje različitih mikrobnih sojeva sa aspekta produkcije ekstracelularnih lipaza i proteaza. U tom smislu biće ispitan veliki broj kvasaca i bakterija iz kolekcije kultura na Tehnološko-metalurškom i Medicinskom fakultetu u Beogradu, kao i komercijalnih lipolitičkih sojeva iz ARS (NRRL) kolekcije kultura (SAD). Među ispitivanim sojevima je i ekstremofilni soj *Pseudomonas aeruginosa* san-ai izolovan iz izrazito alkalnog mašinskog ulja.

Nakon što bude izvršen odabir proizvodnih mikroorganizama, pristupiće se optimizaciji proizvodnje enzima. Proizvodnja mikrobnih enzima može biti poboljšana izborom sastava fermentacione podloge i uslovima kultivacije koji pokazuju pozitivan efekat na genetičku regulaciju sinteze enzima. Kako su lipaze inducibilni enzimi, ispitaće se uticaj različitih induktora, kao i uticaj vrste i količine izvora azota i ugljenika na prinos proizvednih lipaza. Statistička obrada dobijenih rezultata pružiće kvantitativni uvid u uticaj svakog od ispitivanih parametara na biosintezu enzima, kao i njihovu međusobnu interakciju.

Dobijene lipaze i proteaze biće izolovane i prečišćene sa ciljem da se dobijeni enzimi okarakterišu. Dobijeni enzimi će se ispitati sa aspekta temperaturne i pH aktivnost/stabilnosti i specifičnosti za supstrat. Takođe, ispitaće se stabilnost dobijenih lipaza u prisustvu različitih inhibitora lipaza, kao i u organskim rastvaračima.

Na osnovu utvrđenih svojstava dobijenih lipaza i proteaza, razmotriće se njihova primena u industrijskim procesima, odnosno ispitaće se njihova aktivnost i stabilnost u uslovima relevantnim za konkretan proces gde će se najveći deo pažnje posvetiti mogućnosti primene ovih enzima kao aditiva u industriji detergenata. U tom smislu najveći deo istraživanja biće posvećen ekstremofilnom soju *Pseudomonas aeruginosa* san-ai koji, pored lipaza, proizvodi i proteaze. Identifikacija ovog mikroorganizma biće izvršena sekvencioniranjem 16S ribozomalne RNK na osnovu čega će ovaj mikroorganizam biti u potpunosti genetski determinisan. Kao ekstremofilni soj, izolovan iz otpadnog mašinskog ulja, ovaj mikroorganizam opstaje pod izuzetno nepovoljnim uslovima (pH, temperatura, mali sadržaj vode), pa je pretpostavljeno da su i hidrolitički enzimi koje produkuje stabilni u prisustvu detergenata, na povišenim temperaturama u alkalnoj sredini, što su karakteristični uslovi za proces pranja. Ovaj soj je posebno interesantan sa aspekta primene u detergentima jer pored lipaza proizvodi i ekstracelularne proteaze odgovarajućeg temperaturnog i pH profila aktivnosti i stabilnosti pa se istovremenim postupkom i na ekonomičan način potencijalno mogu dobiti dva osnovna sastojka u enzimskim formulacijama detergenata.

Mogućnost primene dobijenih enzima kao aditiva u detergentima će obuhvatiti ispitivanja aktivnosti i stabilnosti dobijenih enzima u prisustvu različitih površinski aktivnih materija, oksidujućih agenasa i dezinficijensa pri različitim koncentracijama i temperaturama sa ciljem razvoja novih enzimskih formulacija detergenta. Takođe, utvrdiće se i podložnost proteolizi proizvedene lipaze koegzistirajućim nativnim proteazama sa ciljem utvrđivanja mogućnosti dugotrajnog skladištenja enzimske formulacije za čišćenje koja bi sadržala oba proizvedena enzima. Predložene formulacije biće okarakterisane i sa aspekta kvaliteta otpadnih voda nakon pranja (HPK i BPK) na osnovu čega će biti predloženo nekoliko enzimskih formulacija za čišćenje različitih namena kao ekoloških proizvoda koji zadržavaju visoku efikasnost pranja pri manjem sadržaju toksičnih hemijskih supstanci.

Poslednjih decenija vršena su intenzivna ispitivanja koja su imala za cilj pronalaženje novih enzima poboljšanih svojstava pogodnih za komercijalnu primenu u detergentima i publikovan je veliki broj radova i патената koji se bavi ovom tematikom. Ovde su navedeni samo neki radovi koji su povezani sa selekcijom i proizvodnjom mikrobnih lipaza i proteaza koji su okarakterisane kao potencijalni aditivi u industriji detergenta:

1. Limpon Bora, Mohan C Kalita, „Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characterization and its potential applications as detergent additive“, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83 (2008) 688–693.
2. K. Thirunavukarasu, N.G. Edwinoliver, S. Durai Anbarasan, M.K. Gowthaman, H. Iefuji, N.R. Kamini, „Removal of triglyceride soil from fabrics by a novel lipase from *Cryptococcus* sp. S-2“, *Process Biochem.*, 43 (2008) 701–706.
3. Jurado, E., Bravo, V., Luzon, G., Fernandez-Serrano, M., Garcia-Roman, M., AltmajerVaz, D., Vicaria, J.M., „Hard-surface cleaning using lipases: enzyme–surfactant interactions and washing tests“ *J. Surfact. Deterg.*, 10 (2007) 61–70.
4. Gaur, R., Gupta, A., Khare, S.K., „Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: production optimization by response surface methodology and application“ *Bioresource Technol.*, 99 (2008) 4796–4802.
5. Nerurkar, M. , Joshi, M., Pariti, S., Adivarekar, R. „Application of Lipase from Marine Bacteria *Bacillus sonorensis* as an Additive in Detergent Formulation“ *J. Surfact. Deterg.*, 16 (2013) 435–443.
6. Uppada, S.R., Gupta, A.K., Dutta, J.R., „Statistical optimization of culture parameters for lipase production from *Lactococcus lactis* and its application in detergent industry“ *International Journal of Chem Tech Research*, 4 (2012) 1509-1517.
7. Wang, H., Zhong, S., Ma, H., Zhang, J., Qi, W., „Screening and characterization of a novel alkaline lipase from *Acinetobacter calcoaceticus* 1-7 isolated from Bohai Bay in China for detergent formulation“ *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (2012) 148-156.
8. Khoramnia A., Ebrahimpour A. , Beh B.K. , Lai O.M., „Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. in submerged and solid-state fermentations“ *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011 Article number702179.
9. Lund H., Kaasgaard S.G., Skagerlind P., Jorgensen L., Jorgensen C.I., Van De Weert M., „Correlation between enzyme activity and stability of a protease, an alpha-amylase

- and a lipase in a simplified liquid laundry detergent system, determined by differential scanning calorimetry“, *J. Surfact. Deterg.*, 15 (2012) 9-21.
10. Romdhane I.B.B., Fendri A., Gargouri Y., Gargouri A., Belghith H., „A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents“, *Biochem.Eng. J.*, 53 (2010) 112-120.
 11. Wang H.K., Shao J., Wei Y.J., Zhang J., Qi, W., „A novel low-temperature alkaline lipase from *Acinetobacter johnsonii* LP28 suitable for detergent formulation“, *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (2011) 96-102.
 12. Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., „Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive“, *Bioresource Technol.* 100 (2009) 3366–3373.
 13. Hmidet N., Ali N.E.H., Haddar A., Kanoun S., Sellami-Kamoun A., Nasri M., „Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: characterization and potential application as detergent additive“, *Biochem.Eng. J.*, 47 (2009) 71–79.
 14. Jain D., Pancha I., Mishra S.K., Shrivastav A., Mishra S., „Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents“, *Bioresource Technol.*, 15 (2012) 228-236.
 15. Kanchana, R., Jadhav, S., Goletkar, Y., Manarekar, G., „Production of alkaliphilic protease(s) by *enterobacter* sp for application in biodetergent formulation“, *Industrial Biotechnology*, 8 (2012) 31-35.

3. Polazne hipoteze

U prvom delu ove doktorske disertacije ispitaće se lipolitička priroda velikog broja mikroorganizama iz kolekcije kultura Katedre za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i ekstremofilnog soja *Pseudomonas aeruginosa* san-ai iz kolekcije kultura Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Među ispitivanim kulturama nalazi se veliki broj kvasaca poput *Kloeckera* sp., *Hansenula* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis* sp., *Candida utilis*, *Pichia* sp. *Rhodotorula* sp., *Candida rugosa* NRRL Y 1496, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095, kao i bakterija *Pseudomonas putida* NRRL B-21 i plesan *Rhizopus oryzae* NRRL 1526.

U ovom radu će se utvrditi mogućnost primene proizvedenih enzima u formulacijama detergenata na osnovu pokazane stabilnosti enzima u prisustvu različitih površinski aktivnih materija, dezinficijensa i oksidacionih agenasa. Pretpostavka je da ekstremofilni mikroorganizmi koji su dobar izvor hidrolitičkih enzima i rastu u ekstremnim uslovima (pH, temperatura, pritisak, mali sadržaj vode), produkuju enzime koji su stabilniji nego enzimi mezofilnih mikroorganizama. Pretpostavka je, dakle, da će u fermentacionim tečnostima različitih vrsta *Pseudomonas* sp. biti nađene proteaze i lipaze koje će imati povećanu stabilnost na povišenim temperaturama u alkalnoj sredini, što su karakteristični uslovi za procese pranja. Na bazi ovih istraživanja biće predložene nove formulacije ekoloških

detergenata različitih sastava i namena. Ove formulacije će biti okarakterisane sa stanovišta efikasnosti odmašćivanja i sastava otpadnih voda od pranja.

Odabrane su sledeće hipoteze sa kojima se započinje istraživanje u ovoj disertaciji i to:

- Testiranje velikog broja mikroorganizama omogućiće pronalaženje enzima tačno određenih karakteristika za primenu u detergentima;
- Enzimi produkovani iz prirodno stabilnih sojeva i sami treba da budu stabilni u nepovoljnim uslovima poput onih u procesu pranja;
- Postupak proizvodnje enzima može se višestruko pospešiti pažljivim izborom komponenata hranljive podloge i parametara procesa;
- Enzimi stabilni u alkalnoj sredini u prisustvu surfaktanata i oksidacionih agenasa mogu imati industrijsku primenu kao aditivi u formulacijama detergenata;
- Primenom enzima omogućava se povećana efikasnost čišćenja pa je moguće smanjenje količine agresivnih supstanci u formulacijama za čišćenje kao i ušteda energije jer se proces pranja može vršiti pri nižim temperaturama u skladu sa principima zaštite životne sredine i prirodnih resursa.

4. Metode istraživanja

Produkcija lipaza pomoću navedenih mikroorganizama biće ispitana uzgajanjem na selektivnom medijumu-tributirin agaru sa i bez dodatka fluorescentne boje Rhodamine B. Mikroorganizmi producenti lipaza će biti selektovani na osnovu veličine prozirne zone oko izraslih kolonija nakon 72 h, odnosno na osnovu veličine fluorescirajuće zone nakon osvetljavanja UV svetlošću u podlozi sa dodatkom Rhodamine B. Takođe, biće ispitana i mogućnost proizvodnje proteaza istim mikroorganizmima, na osnovu pokazane aktivnosti na kazein agaru.

Proizvodnja lipaza pomoću izabranih mikroorganizama biće vršena tehnikom submerznog gajenja u osnovnim i obogaćenim podlogama kako bi se željeni enzim dobio u odgovarajućem prinosu. Optimizacija postupka proizvodnje lipaza u tečnim podlogama će se zasnivati na inducibilnoj prirodi ovih enzima. Pored kvalitativnog sastava podloge, utvrđeno je da na prinos utiču koncentracije svih komponenti fermentacione tečnosti i njihovi međusobni odnosi. Uticaji najvažnijih procesnih parametara ispitaće se primenom metode planiranih eksperimenata kako bi se postupak proizvodnje optimizovao sa stanovišta prinosa i sastava smeše enzima. Dobijeni enzimi će po potrebi biti prečišćavani frakcionim taloženjem amonijum-sulfatom i izvršiće se njihova primarna karakterizacija sa ciljem određivanja optimalnih temperatura i pH, kao i temperaturnog i pH profila stabilnosti. Naime, da bi enzim mogao biti upotrebljen kao aditiv u formulacijama detergenata, njegov pH optimum bi se morao nalaziti u alkalnoj sredini ($\text{pH} \geq 8,5$). Dalje, proizvedeni enzim bi morao da bude stabilan i aktivan na povišenim temperaturama na kojima se često vrši proces pranja, iako se usled povećanja efikasnosti čišćenja dodatkom enzima postupak pranja može vršiti i pri nižim temperaturama a u skladu sa novim tendencijama uštede energije.

Pored toga, enzim mora biti stabilan u prisustvu velikog broja površinski aktivnih materija koje najčešće imaju denaturišuće ili dezaktivirajuće dejstvo na enzim. U ovoj

doktorskoj disertaciji će se ispitati uticaj nekoliko anjonskih i nejonskih površinski aktivnih materija na lipolitičku i proteolitičku aktivnost sirovih enzimskih preparata. Među ispitivanim surfaktantima su i natrijum dodecil benzoat sulfonat (SDBS) i natrijum dodecil sulfat (SDS) koji se smatraju najagresivnijim agensima u formulacijama detergenata i koji pokazuju snažno dezaktivirajuće dejstvo na enzime, a koji su najčešća komponenta savremenih formulacija detergenata. Takođe, ispitaće se i različite komercijalne nejonske površinski aktivne materije na bazi estara polialkohola koje se koriste u modernim formulacijama detergenata.

Takođe, da bi enzim mogao da bude upotrebljen kao aditiv u detergentima, neophodno je da poseduje i oksidativnu stabilnost. Naime, oksidaciona sredstva poput vodonik-peroksida ili natrijum-hipohlorita, iako se ne nalaze u samoj formulaciji detergenta, često dodaju u toku samog procesa pranja. Aktivnosti enzima u prisustvu oksidacionih sredstava je veoma značajno svojstvo za njihovu primenu u industrijskim sredstvima za čišćenje jer veliki broj nativnih enzima ga ne poseduje. Veća stabilnost enzima u prisustvu oksidacionih agenasa se najčešće postiže konstrukcijom novih enzima metodama molekularnog inženjerstva, što je dosta zametno i skupo. Fermentacioni procesi za proizvodnju enzima podrazumevaju kultivaciju aktivnog soja izabranog mikroorganizma, koji će proizvoditi enzim sa dobrim komercijalnim prinosom i sa poželjnim karakteristikama u pogledu pH i temperaturnog profila, kao i specifičnosti za supstrat. Proizvodnja mikrobnih enzima može biti optimizovana izborom sastava fermentacione podloge i uslovima kultivacije koji pokazuju pozitivan efekat na genetičku regulaciju sinteze enzima.

Nakon preliminarnih ispitivanja koja imaju za cilj izbor promenljivih koje pokazuju najveći uticaj na proizvodnju lipaza, uslovi fermentacije biće optimizovani metodom statističke obrade podataka.

Izabraće se centralni kompozitni rotabilni dizajn sa 4 faktora i na 5 nivoa. Na ovaj način će se kvantitativno utvrditi uticaj svakog faktora na proizvodnju lipaze, kao i njihova međusobna korelacija. Ispitaće se mogućnost matematičkog opisivanja dobijenih rezultata regresionim modelom drugog reda koji uključuje interakciju između faktora:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i,j,i < j}^4 b_{ij} x_i x_j$$

gde je y očekivani odziv (lipolitička aktivnost), b_0 odsečak, b_i linearni koeficijent, b_{ij} koeficijent interakcije između varijabli. Regresionom i disperzionom analizom ispitaće se adekvatnost regresionih modela korišćenjem odgovarajućih kompjuterskih programskih paketa (Matlab). Adekvatnost modela biće ocenjena na osnovu Fišerovog koeficijenta. Signifikantnost koeficijenata regresije ispitaće se primenom Studentovog testa.

Svi postupci utvrđivanja enzimске aktivnosti vršiće se prema originalnim ili modifikovanim procedurama iz literature. Aktivnosti enzima biće određivane spektrofotometrijski, praćenjem brzine hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata za lipaze i azo-kazeina za proteaze. Sadržaj proteina određivaće se standardnom spektrofotometrijskom metodom po Lowry-ju. Dobijeni enzimski preparati biće koncentrisani i prečišćeni metodom frakcionog taloženja amonijum-sulfatom, kao i različitim hromatografskim metodama (gel-filtraciona hromatografija, jonoizmenjivačka hromatografija), a tok prečišćavanja kao i čistoća finalnog preparata biće praćeni elektroforetski (nativna i SDS-PAGE elektroforeza).

Mogućnost primene dobijenih enzimskih preparata kao aditiva u detergentima biće ocenjena na osnovu stabilnosti proizvedenih enzima u prisustvu različitih površinski aktivnih materija, dezinficijensa i oksidacionih agenasa. Na osnovu ovih istraživanja biće osmišljene različite formulacije čija će se efikasnost uklanjanja masnoća ocenjivati spektrofotometrijski na osnovu promene refleksije tkanina zaprljanih obojenim trioleinom (primenom „Sudan red“ boje) pre i nakon pranja.

5. Očekivani naučni doprinos

Kao osnovni naučni doprinos doktorske disertacije očekuje se razvoj originalnog tehnološkog postupka za proizvodnju enzimskih formulacija detergenta zasnovanog na primeni enzima proizvedenih iz vlastitih sojeva po sopstvenoj tehnologiji. Kao rezultat predloženih istraživanja očekuju se sledeći pojedinačni naučni doprinosi:

- razvoj mikrobiološke proizvodnje novih enzima na laboratorijskom nivou kao osnovnih bioaktivnih komponenti novih formulacija detergenta. U tom smislu će se izvršiti odabir proizvodnih sojeva koji produkuju hidrolitičke enzime poboljšanih svojstava za primenu u detergentima;
- optimizacija procesnih parametara i sastava hranljive podloge pri mikrobiološkoj proizvodnji lipaza i proteaza pomoću nekoliko odabranih proizvodnih sojeva;
- utvrđivanje regulatornih mehanizama biosinteze lipaza i proteaza pri kultivaciji odabranih proizvodnih sojeva;
- utvrđivanje kinetike proizvodnje enzima i ćelijskog rasta pri optimalnim uslovima;
- razvoj efikasnih postupaka izolacije i prečišćavanja enzima iz fermentacionih tečnosti;
- detaljna karakterizacija proizvedenih lipaza i proteaza;
- formulacija nekoliko novih proizvoda na bazi lipaza i proteaza koji pokazuju zadovoljavajuća svojstva sa stanovišta efikasnosti čišćenja u procesu pranja, stabilnosti pri skladištenju i sastava otpadnih voda od pranja u poređenju sa komercijalnim hemijskim detergentima;

Očekuje se da će se primenom enzimskih formulacija za čišćenje postići isti efekti u pranju, dezinfekciji i odmašćivanju kao i sa agresivnim hemijskim detergentima uz značajno smanjenje toksičnih i korozivnih materija pa se novi preparati za čišćenje tkanina, kao i radnih površina u prehrambenoj industriji zbog svojih svojstava mogu smatrati ekološkim proizvodima.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Predmet rada ove doktorske disertacije je proizvodnja novih enzimskih preparata koji mogu imati komercijalnu primenu kao aditivi u industriji detergenta. U toku rada na disertaciji predviđene su sledeće faze i aktivnosti u istraživanju:

1. Izvršiće se testiranje većeg broja mikroorganizama sa ciljem pronalaženja lipolitičkih mikroorganizama koji produkuju enzim željenih karakteristika.
2. Ispitaće se uticaj osnovnih parametara na biosintezu enzima kao što su sastav podloge, temperatura, uticaj dodatka induktora, uticaj veličine inokuluma i sl., pri čemu će biti primenjene metode planiranog eksperimenta i matematičko-statistička obrada eksperimentalnih podataka.
3. U cilju određivanja potencijalne primene proizvedenih enzima, ispitaće se i uticaj temperature, pH i različitih jona na aktivnost i stabilnost dobijenih lipaza. Takođe, ispitaće se i mogućnost proizvodnje proteolitičkih enzima pomoću istih proizvodnih sojeva, kao i karakteristike proizvedenih proteaza.
4. U drugom delu rada će se dobijeni enzimi ispitati sa aspekta primene u detergentima, pa će se sa tim ciljem pratiti stabilnost ovih enzima u prisustvu različitih površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata pri različitim koncentracijama i na različitim temperaturama u blago alkalnoj sredini.
5. U poslednjem delu rada će se na osnovu dobijenih rezultata formulisati nekoliko preparata za čišćenje različitih namena koje će biti ocenjene na osnovu sposobnosti uklanjanja masnih onečišćenja, stabilnosti pri skladištenju, kao i sastava otpadnih voda nakon pranja (HPK i BPK).

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 prethodnih istraživanja koja se odnose na:

- savremena sredstva za čišćenje;
- enzimi kao aditivi u detergentima;
- lipaze i njihova svojstva;
- proteaze i njihova svojstva;
- mikrobiološka proizvodnja enzima (osnovni principi proizvodnje, regulatorni mehanizmi, uticaji različitih procesnih parametara i sastava hranljive podloge na proizvodnju enzima);
- pregled proizvodnje enzima kao aditiva u detergentima u literaturi.

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

- Materijali i hemikalije korišćene u radu;
- Opis eksperimentalnih tehnika za ispitivanje lipolitičke i proteolitičke aktivnosti mikroorganizama;
- Opis eksperimentalnih tehnika identifikacije mikroorganizama izolovanih iz prirodnih staništa;
- Opis eksperimentalnih tehnika za izolaciju i prečišćavanje enzima;
- Opis tehnika za biohemijsku karakterizaciju lipaza i proteaza;
- Eksperimentalni plan optimizacije produkcije enzima;
- Eksperimentalni plan optimizacije formulacije detergenta.

Poglavlje *Rezultati i diskusija* sadržaće detaljan prikaz svih dobijenih rezultata kao i njihovu diskusiju. Detaljno će biti prodiskutovani rezultati vezani za optimizaciju proizvodnje lipaza i proteaza pomoću nekoliko prethodno odabranih sojeva. Kvantitativno će se razmatrati uticaji procesnih parametara na količinu proizvedenih enzima i njihove međusobne interakcije. Na osnovu dobijenih rezultata o uticajima dodatka određenih supstanci u hranljivu podlogu na količinu proizvedenog enzima, razmatraće se regulatorni mehanizmi njihove biosinteze. Posebno će biti diskutovani uticaji različitih jonskih i nejonskih površinski aktivnih materija, kao i oksidacionih agenasa, na aktivnost lipaza i proteaza i svojstva proizvedenih enzima sa aspekta njihove primene kao aditiva u detergentima. Na osnovu dobijenih rezultata primenom eksperimentalnog plana i statističke regresije predložiće se formulacije detergenata sa optimalnim sastavom.

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: „Proizvodnja mikrobni lipaza i proteaza kao aditiva u formulacijama detergenata“, koju je predložila Sanja Grbavčić dipl. inž., naučno zasnovana i da predstavlja značajan naučni doprinos naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da kandidatu Sanji Grbavčić 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, 16.09.2013.

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor
Tehnološko-Metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Dejan Bezbradica, docent
Tehnološko-Metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Suzana Dimitrijević, vanredni profesor
Tehnološko-Metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Ivanka Karadžić, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu