

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Nevene Luković, dipl. inž. tehnologije

Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 27.06.2013. godine (odlukom 35/204 br. od 27.06.2013. godine), imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Nevena Luković pod naslovom

„Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina“

Posle pregleda dostavljene disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa kandidatom, Komisija je sačinila sledeći

R E F E R A T

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

20.9.2012. godine, na sednici Naučno-nastavnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta formirana je komisija za ocenu teme doktorske disertacije kandidata Nevena Luković, dipl. inž pod nazivom: "Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina".

25.10.2012. godine, na sednici Naučno-nastavnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta podnet je izveštaj o oceni teme doktorske disertacije Nevene Luković, dipl.inž pod naslovom: "Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina", a za mentora ove doktroske disertacije imenovana je Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor TMF-a.

19.11.2012. godine, je doneta odluka Veća naučnih oblasti na Univerzitetu o prihvatanju teme doktorske disertacije Nevene Lukovic dipl.inž pod naslovom: "Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina".

27.06.2013. godine, na sednici Naučno-nastavnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Nevene Luković, dipl.inž pod nazivom "Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina".

Odlukom Nastavno-naučnog veća održanog 07.02.2008. godine, kandidat prelazi sa magistarskih na doktorske studije Tehnološko-metalurškog fakulteta na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju (mentor dr Zorica Knežević-Jugović, van. prof). Odlukom Nastavno-naučnog veća održanog 26.9.2013. produžen je rok za završetak doktorskih studija.

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo za koju je matična ustanova Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Za mentora je izabrana dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor TMF-a iz uže naučne oblasti Biohemijsko

inženjerstvo i biotehnologija, koja je na osnovu objavljenih publikacija i iskustva kompetentna da rukovodi izradom ove doktorske disertacije.

1.3. Biografski 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. 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 jula 2013. godine angažovana je na bilateralnom naučnoistraživačkom projektu između Republike Srbije i Narodne Republike Kine, pod nazivom "*Primena poljoprivrednog otpada za proizvodnju enzima*". 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.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Nevene Luković napisana je na 141 strana, sa ukupno 6 poglavlja, 49 slika, 9 tabela i 207 literaturna navoda. Doktorska disertacija sadrži sledeća poglavlja: Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultate i diskusiju, Zaključak i Literaturu, uz izvode na srpskom i engleskom jeziku.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U **Uvodu** disertacije data su osnovna razmatranja značaja alternativnih goriva. Prikazane su prednosti i problemi pri korišćenju biogoriva, pre svega biodizela, u odnosu na fosilna goriva. Takodje je predstavljena i prednost enzimske sinteze u odnosu na dosad razvijene procese hemijske proizvodnje. Na kraju poglavlja su predstavljeni ciljevi rada sa planom istraživanja.

U **Teorijskom** delu je detaljno opisan razvoj primene alternativnih goriva. Opisani su različiti metodi korišćenja ulja i njihovih derivata kao biogoriva. Razmotrene su prednosti primene biodizel goriva i njegove glavne karakteristike. Dat je prikaz hemijskih sinteza biodizela: kiselo, bazno, heterogeno katalizovane kao i nekatalizovane. Predstavljene su prednosti enzimske sinteze biodizela kao i važna svojstva lipaza kao biokatalizatora ovog procesa uključujući njihovu specifičnost, strukturu i mehanizam delovanja. Poseban osvrt je dat na katalitička svojstva i mehanizam delovanja tri lipaze, koje se koriste u ovoj disertaciji kao biokatalizatori u sintezi biodizela. Dat je pregled i analiza karakteristika i značajnih parametara koji utiču na enzimsku

sintezu biodizela. Razmotreni su različiti izvori sirovina i acil akceptora, kao i uticaj rastvarača, temperature i sadržaja vode na enzimsku transesterifikaciju. Izložene su, do sada u literaturi poznate, konfiguracije enzimskih reaktora koje su korišćene u proizvodnji biodizela i njihova industrijska primena sa posebnim osvrtom na enzimске reaktore korišćene u disertaciji. Predstavljene su različite metode imobilizacije lipaza za ove namene, posebno kovalentne imobilizacije i tehnike imobilizacije prethodno hemijski modifikovane lipaze uvođenjem amino grupe u molekul i drugim postupcima.

Eksperimentalni deo se sastoji od dva poglavlja: Materijali i Metode. U prvom poglavlju navedeni su materijali korišćeni u ovim istraživanjima. U drugom poglavlju navedene su metode i uslovi koji su korišćeni u eksperimentalnom radu, prema redosledu eksperimentalnog istraživačkog rada. Prvo su opisani uslovi i metodi za enzimsku sintezu biodizela u jednostepenim i višestepenim procesima. Opisane su procedure korišćene za ispitivanje uticaja temperature, sadržaja vode, koncentracije enzima i molarnog odnosa acil-akceptor/ulje na prinos metil estara. Prikazani su i centralni rotabilni eksperimentalni planovi koji su se koristili za ispitivanje uticaja osnovnih parametara procesa na prinos biodizela i produktivnost procesa. Prikazan je i način selekcije acil-akceptora. Navedene su hromatografska metoda za određivanje sadržaja metil estara, metode za određivanje lipolitičke aktivnosti enzima kao i metode za određivanje ukupnog sadržaja proteina (metode po Loriju i Bredfordu). Opisane su metode i uslovi imobilizacije enzima, posebno procedure korišćene za aktivaciju nosača, kao i metode korišćene za hemijske modifikacije lipaza. Opisane su metode korišćene za karakterizaciju imobilisanog enzima i to metode za određivanje aktivnosti imobilisanog enzima, prinosa imobilizacije i metode Furijeove transformacijske infracrvene spektroskopije (FTIR) za karakterisanje hemijski modifikovanih lipaza i njihovog načina vezivanja za različite nosače na bazi polimetakrilata.

Poglavljje **Rezultati i diskusija** obuhvata prikaz rezultata dobijenih u eksperimentalnom radu u ovoj disertaciji, njihovu analizu i diskusiju koja uključuje poređenje sa objavljenim radovima ili sličnim ispitanim sistemima. Rezultati i diskusija se sastoje od šest poglavlja: Uticaj vrste biokatalizatora i načina izvođenja procesa na sintezu biodizela, Optimizacija enzimskog postupka sinteze biodizela imobilisanom lipazom iz *Rhizomucor miehei*, Optimizacija enzimskog postupka sinteze biodizela imobilisanom lipazom iz *Candida antarctica*, Uticaj acil akceptora na sintezu biodizela, Enzimska sinteza biodizela u reaktoru sa pakovanim slojem i Primena polimetakrilatnih nosača modifikovanih cisteinom u imobilizaciji lipaze. U **prvom poglavlju** predstavljen je odabir optimalnog biokatalizatora sa aspekta prostorno-vremenskog prinosa reaktora i produktivnosti procesa. Takođe, ispitan je uticaj dodavanja metanola u reakcionu smešu u cilju smanjenja negativnog uticaja polarnog alkohola na aktivnost enzima. Optimizovan je postupak višestepenog dodavanja metanola u skladu sa dinamikom njegove potrošnje. U **drugom poglavlju** dat je osvrt na statističke metode planiranja eksperimenata u cilju optimizacije procesnih parametara, kojima se smanjuje broj neophodnih eksperimenata, čime se neminovno smanjuju troškovi istraživanja, dok se istovremeno dobijaju informacije o međusobnim interakcijama varijabli u posmatranom opsegu. Izvršena je optimizacija procesa enzimske sinteze metilestara lipazom iz *Rhizomucor miehei* korišćenjem rotabilnog kompozicionog eksperimentalnog plana. Za obradu podataka je korišćena metodologija odzivnih površina. Dobijena su i ispitana dva modela: pojedinačan i kombinovan uticaj procesnih parametara na brzinu enzimske reakcije i njihov uticaj na brzinu enzimske reakcije po količini enzima. Rezultati su upoređeni i prodiskutovani. Dobijeni rezultati su ukazali na to da se najveći prinos ostvaruje pri sledećim parametrima reakcije: 45 °C, molarni odnos metanol/ulje 6:1 i bez dodate vode u sistem. Rezultati takođe ukazuju da enzimska sinteza biodizela, lipazom iz *R. miehei* nije ekonomski prihvatljiva kada se izvodi u saržnom sistemu uprkos određenom povećanju prinosa proizvoda zbog male stabilnosti biokatalizatora u prisustvu metanola. U **trećem poglavlju** je izvršena optimizacija procesa enzimske sinteze metilestara lipazom iz *Candida antarctica* korišćenjem rotabilnog kompozicionog eksperimentalnog plana. Ispitan je uticaj četiri parametra na pet nivoa: početne koncentracije vode, koncentracije enzima, molarnog odnosa metanol/ulje i temperature. Statistička analiza je pokazala da, kada se u sintezi biodizela kao biokatalizator koristi

lipaza iz *C. antarctica*, najznačajniji parametri su količina vode i molski odnos metanol/ulje koji u posmatranom ispitivanom opsegu imaju negativan uticaj. Najbolji rezultati su dobijeni u sistemu sa visokom koncentracijom enzima, nižem sadržaju metanola u sistemu, povišenoj temperaturi i malim sadržajem vode. U **četvrtom poglavlju** su predstavljeni rezultati uticaja vrste acil-akceptora na sintezu biodizela. Naime, u pokušaju da se poboljša stabilnost imobilisanog sistema sa lipazom iz *C. antarctica*, ispitana je mogućnost korišćenja drugih alkohola različite strukture i dužine lanca. Utvrđeno je da se, osim metanola, mogu koristiti i drugi alkoholi, ali da se visoki prinosi mogu ostvariti samo u višestepenim procesima pri dodavanju alkohola u porcijama. Zamena metanola sa manje polarnim alkoholima (propanol, butanol) je rezultirala samo blagim povećanjem aktivnosti lipaza, pošto i dalje dolazi do značajne inaktivacije enzima usled negativnog dejstva samih alkohola na konformaciju enzima. Zato je ispitana mogućnost korišćenja i drugih nukleofila osim alkohola u reakciji sinteze biodizela, kao, na primer, metil-acetata. Dokazano je da se u reakciji sa metil-acetatom značajno povećava stabilnost lipaze, i usled toga, produktivnost procesa, uglavnom zbog toga što se umesto glicerola sintetiše triacetilglicerol, koji nema negativan uticaj na aktivnost i stabilnost lipaze. Korišćenjem metil-acetata ostvareni su visoki prinosi od preko 95% i, što je podjednako bitno, u ovom slučaju razvijen je jednostavniji jednostepeni postupak sinteze. U **petom poglavlju** ispitana je mogućnost sinteze biodizela u reakciji transesterifikacije suncokretovog ulja metil- i etil-acetatom u reaktoru sa pakovanim slojem biokatalizatora (imobilisane lipaze iz *C. antarctica*) sa i bez recirkulacije pri različitim operativnim uslovima. Ispitan je uticaj vremena zadržavanja reakcione smeše na stepen konverzije, stabilnost i produktivnost imobilisanog sistema. Dobijeni rezultati su pokazali da je ovakav imobilisani bioreaktorski sistem veoma efikasan u cilju proizvodnje biodizela u sistemu bez organskog rastvarača u većim razmerama. U **šestom poglavlju** je ispitana mogućnost primene novog postupka imobilizacije native lipaze iz *C. rugosa* na Eupergit® C 250L. Ispitana je efikasnost hemijske modifikacije epoksidnih grupa u komercijalnom nosaču, Eupergitu® C 250L, pomoću cisteina i glutaraldehida radi dobijanja imobilisanog enzima veće stabilnosti. Utvrđeno je da se postiže veća specifična aktivnost lipaze iz *C. rugosa* kada se vezuje za modifikovan nosač u poređenju sa vezivanjem na nemodifikovan nosač. Takođe je, analizom desorpcije enzima sa nosača, kao i primenom metode Furijeove transformacijske infracrvene spektroskopije (FTIR), utvrđeno da se imobilizacija na modifikovan nosač odvija pretežno formiranjem kovalentne veze sa neznatnim učešćem adsorpcije. Ispitana je i mogućnost hemijske modifikacije samog enzima različitim alifatičnim aminima uvođenjem amino grupa u molekul. Kako su postignuti dobri rezultati u pogledu aktivnosti i stabilnosti imobilisanog enzima sa lipazom iz *C. rugosa*, ispitana je mogućnost primene novog postupka pri imobilizaciji native lipaze iz *C. antarctica* na Eupergit® C 250L, koja je efikasniji biokatalizator u sintezi biodizela. Imobilisani enzim nastao kovalentnim vezivanjem hemijski modifikovane lipaze na modifikovan nosač je pokazao veću aktivnost od imobilizata u kome je samo nosač modifikovan etilendiaminom, kao i veću aktivnost u odnosu na enzim imobilisan na nemodifikovan nosač. Utvrđeno je da se ovako imobilisana lipaza iz *C. antarctica* može uspešno koristiti kao biokatalizator u sintezi biodizela. Primenom lipaze iz *C. antarctica* na novi modifikovan nosač dobijaju se prinosi koji su u rangu prinosa koje daju komercijalni preparati sa imobilisanom lipazom iz *C. antarctica*.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

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. 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 proizvodnjom i

korišćenjem alternativnih goriva i izdale su Direktivu o promociji korišćenja biogoriva i drugih obnovljivih goriva za transport. Direktiva je predviđala 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.

Hemijski postupak za sintezu biodizela koristi se u industrijskim razmerama već decenijama, ali su uočeni izvesni nedostaci u ovakvom načinu proizvodnje: veliki energetske troškovi, stvaranje nusprodukata u sporednim reakcijama, potreba za neutralizacijom katalizatora i izdvajanjem nastalog glicerola iz reakcione smeše. 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.

U ovoj doktorskoj disertaciji je razvijen postupak enzimskog dobijanja biodizela lipazom iz *C. antarctica*. Bitno je naglasiti da je razvijen sistem u šaržnom i reaktoru sa pakovanim slojem bez organskog rastvarača što je posebno interesantno i značajno za industrijsku primenu. Povećana je i operativna stabilnost imobilisanog enzima primenom različitih acil akceptora. Da bi se procenio uticaj različitih faktora na prinos biodizela primenjena je metoda višefaktornih eksperimentalnih planova (centralni kompozicioni rotabilni plan) koja omogućava da se da utvrdi uticaj nekoliko faktora istovremeno, te da se odredi intenzitet tih uticaja kao i njihova moguća interakcija. U drugom delu doktorske disertacije razvijene su nove tehnike za imobilizaciju lipaze od značaja u sintezi biodizela.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U okviru doktorske disertacije citirano je 207 literaturnih navoda koji su omogućili da se prikaže stanje u ispitivanoj oblasti, kao i aktuelnost problematike. Savremena istraživanja objavljena u navedenim naučnim radovima su opisana, analizirana i prodiskutovana i izvedeni su zaključci koji su omogućili dobar uvid u do sada postignute rezultate u oblasti sinteze i primene biodizela. Na osnovu ovog preseka stanja u literaturi izložene su osnovne smernice za istraživanja koja su izvršena u ovoj doktorskoj disertaciji. Iz obrazloženja predložene teme doktorske disertacije i objavljenih radova u prijavi, koju je kandidat podneo, kao i iz popisa literature koja je korišćena u istraživanju, uočava se adekvatno poznavanje predmetne oblasti istraživanja, kao i poznavanje aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

Prinosi metil estara masnih kiselina ostvareni enzimskom transesterifikacijom ulja su određivani metodom gasne hromatografije. Uzorci su pripremani po već utvrđenom postupku sa internim standardom.

Za dobijanje i karakterizaciju imobilisanih enzima koristile su se savremene hemijske i instrumentalne metode. Svi postupci hemijske modifikacije enzima kao i imobilizacije enzima su se izvodili prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature. Dobijeni imobilisani enzimi su okarakterisani prema standardnim metodama za određivanje termostabilnosti i operativne stabilnosti, dok je obrazovanje hemijskih veza između enzima i nosača potvrđeno FTIR spektroskopijom. Standardna aktivnost lipaza je određivana spektrofotometrijskom metodom pri

čemu se koristio *p*-nitrofenil-palmitat kao supstrat, dok je sadržaj proteina određivan standardnim spektrofotometrijskim metodama po Loriju i Bredfordu.

Za optimizaciju procesnih parametara u različitim sistemima (sistemi bez organskih rastvarača sa metanolom ili drugim acil-akceptorom, šaržni sistem, protočni reaktor) koristile su se metode planiranih eksperimenata koje su se zasnivale 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 omogućiti pouzdana kontrola i regulacija procesa.

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Na osnovu pregleda do sada objavljenih eksperimentalnih podataka i rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije ostvaren je značajan doprinos u implementaciji lipaza u cilju sinteze biodizela. Definisani su optimalni procesni parametri, kao i režim rada bioreaktora za kontinualnu sintezu biodizela u sistemu sa imobilisanom lipazom. Razvijen je postupak modifikacije polimetakrilatnih nosača cisteinom i glutaraldehidom koji pokazao se kao praktičan i jednostavan metod za imobilizaciju enzima koji može da ima veliku primenu u enzimskoj sintezi biodizela. Zaključci i rezultati izneti u disertaciji su bitni za dalji razvoj enzimski katalizovane sinteze biodizela.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

Kandidat Nevena Luković je diplomirani inženjer tehnologije. Tokom izrade doktorske disertacije ispoljila je izuzetnu stručnost u pripremi i realizaciji eksperimenata i korišćenju različitih tehnika i metoda, a pri analizi rezultata je pokazala samostalnost, sistematičnost i kreativnost. Na osnovu dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalni naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Doprinos rezultata ove teze može se posmatrati sa sledećih stanovišta:

- U ovom radu ispitan je originalan postupak enzimske sinteze biodizela. Dokazano je da se lipaze iz različitih izvora mogu uspešno primeniti u reakciji transesterifikacije biljnih ulja i da kao biokatalizatori imaju niz prednosti nad klasično industrijski korišćenim katalizatorima.
- Izvršena je optimizacija procesnih parametara za enzimsku reakciju transesterifikacije suncokretovog ulja i metanola sa dva različita enzima, lipazom iz *R. miehei* i lipazom iz *C. antarctica*, u sistemima sa organskim rastvaračem i bez rastvarača, primenom metoda planiranih eksperimenata pomoću kojih su dobijeni matematički modeli koji omogućavaju da se predvidi ponašanje sistema u zavisnosti od promene procesnih parametara.
- Razvijen je originalni enzimski postupak za proizvodnju biodizela koji se zasniva na primeni novog acil-akceptora, metil acetata, i imobilisane komercijalne lipaze iz *Candida antarctica* u sistemu bez organskog rastvarača. Postupak sinteze je znatno uprošćen i smanjeni su operativni troškovi zbog mogućnosti izvođenja jednostepenog enzimskog procesa i povećane operativne stabilnosti sistema.
- Razvijen je i optimizovan reaktorski sistem sa pakovanim slojem imobilisanog komercijalnog enzima koji je pokazao veliku operativnu stabilnost.

- Razvijen je i novi biokatalizator sa kojim je ostvarena produktivnost sistema istog reda veličine kao sa prethodno korišćenom komercijalnom imobilisanom lipazom iz *C. antarctica*. Uspešno je izvedena kovalentna imobilizacija native *C. antarctica* na nosač na bazi polimetakrilata koja se zasnivala na prethodnoj hemijskoj modifikaciji i enzima i nosača, pri čemu je smanjena mogućnost vezivanja enzima za nosač adsorpcijom. Dokazano je da se ovako imobilisana lipaza iz *C. antarctica* može uspešno koristiti kao biokatalizator u sintezi biodizela u reaktoru sa pakovanim slojem. Primenom lipaze iz *C. antarctica* na novi modifikovan nosač dobijaju se prinosi biodizela koji su u rangu prinosa koje daju komercijalni preparati sa imobilisanom lipazom iz *C. antarctica*

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Pregledom dostupne literature iz ove oblasti istraživanja koja razmatra sintezu alternativnih goriva, kao i razmatranjem rezultata istraživanja dobijenih primenom odabrane metodologije u ovoj doktorskoj disertaciji, može se uočiti da se dobijeni rezultati nadovezuju na već stečena znanja, ali i značajno dopunjuju postojeće rezultate. Ova doktorska disertacija predstavlja značajan korak ka praktičnoj primeni enzima u postupcima transesterifikacije, kao i primeni imobilisanih enzima u reaktorskim sistemima. Takođe je značajno naglasiti značaj razvijenih novih metoda imobilizacije lipaza na polimetakrilatne nosače koji imaju potencijalnu primenu u postupcima sinteze biodizela.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Nevena Luković je rezultate svog istraživanja tokom izrade ove disertacije potvrdila objavljivanjem poglavlja u knjizi međunarodnog značaja, radova u časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja i saopštavanjem radova na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Prvi je autor poglavlja u knjizi međunarodnog značaja (M14), rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), kao i dva rada u međunarodnom časopisu (M23) i rada objavljenog u nacionalnom časopisu (M51).

Kategorija 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.

Kategorija M21:

1. **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*, vol. 100, no. 21, pp. 5146-5154, 2009, (ISSN 0960-8524) (IF(2008)=4.453) (IF(2010, petogodišnji)=4.901); *Biotechnology & Applied Microbiology* (18/145); *Agricultural Engineering* (1/9).

Kategorija M22.1:

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

Kategorija M23:

1. 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*, vol. 71, no. 1, pp. 31-41, 2006 (ISSN 0352-5139) (IF(2006)=0.536) (IF(2007, petogodišnji)=0.591); *Chemistry/Multidisciplinary* (101/124).

2. **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*, vol. 73, no.2, pp. 147–156, 2008, (ISSN 0352-5139) (IF(2009)=0.820) (IF(2009, petogodišnji)=0.774), Chemistry/Multidisciplinary (87/140).
3. **N. Ognjanović**, S. Petrović, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela", *Hemijska Industrija*, vol. 64 no. 1, pp. 1-8, 2010 (ISSN 0367-598X) (IF(2010)=0.205); Engineering/Chemical (120/133).
4. M. Bradić, **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, S. Grbavčić, N. Avramović, D. Mijin, Z. Knežević-Jugović, "Enzimska sinteza monoacilglicerola", *Hemijska Industrija*, vol. 64, no. 5, pp. 375-388, 2010 (ISSN 0367-598X) (IF(2010)=0.205); Engineering/Chemical (120/133).

Kategorija M33

1. **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, 26.-30. May, 2008, pp. 228-1 – 228-6.

Kategorija M34:

1. 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.

Kategorija M51

1. **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

Kategorija M63:

1. **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, pp. 69-72.
2. **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, pp. 55-58.
3. 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, pp. 196-199.
4. **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, pp. 37-40.

Kategorija M64:

1. **N. Ognjanović**, D. Bezbradica, Z. Knežević, „Optimizacija procesa sinteze biodizela katalizovana lipazama *Zbornik radova prezentovanih u okviru 44. savetovanja SHD*, Beograd, 2006, Izvodi radova, BT-P05, 32.
2. **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.

3. 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.

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu prethodno iznetih razmatranja rezultata doktorske disertacije Nevene Luković, dipl. inž. pod nazivom „**Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina**” smatramo da su ispunjeni svi ciljevi i zadaci rada na ovoj tezi i da ona svojim sadržajem i kvalitetom značajno doprinosi oblasti Tehnološko inženjerstvo, što je i potvrđeno objavljivanjem radova u međunarodnim časopisima, kao i publikovanjem rezultata na međunarodnim i nacionalnim konferencijama.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću TMF-a da se doktorska disertacija pod nazivom „**Razvoj enzimskog postupka za sintezu metil estara masnih kiselina**” kandidata Nevene Luković prihvati, izloži na uvid javnosti i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu. Takođe, da se nakon završetka ove procedure, kandidat pozove na usmenu odbranu disertacije pred Komisijom u istom sastavu

ČLANOVI KOMISIJE

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

dr Dejan Bezbradica, docent TMF
Univerziteta u Beogradu

dr Dušan Mijin, redovni profesor TMF
Univerziteta u Beogradu

dr Ljiljana Mojović, redovni profesor TMF
Univerziteta u Beogradu

dr Mirjana Antov, redovni profesor,
Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu

