

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Сање Ж. Грбавчић, дипл. инж. технологије.

Одлуком 30/27 бр. од 26.05.2014. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Сање Ж. Грбавчић под насловом

Производња микробних липаза и протеаза као адитива у формулацијама детергената

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

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

27.06.2013. – Кандидат Сања Ж. Грбавчић, дипл. инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „Производња микробних липаза и протеаза као адитива у формулацијама детергената“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме (одлука бр. 35/199 од 27.06.2013. године).

26.09.2013.– На седници Наставно-научног већа Технолошко Металуршког факултета, на основу поднетог извештаја Комисије, донета је Одлука о прихватању предлога теме докторске дисертације Сање Ж. Грбавчић, дипл. инж. технологије, под називом „Производња микробних липаза и протеаза као адитива у формулацијама детергената“ и за ментора ове докторске дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а.

14.10.2013.– На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Сање Ж. Грбавчић, дипл. инж. технологије, под називом „Производња микробних липаза и протеаза као адитива у формулацијама детергената“.

22.05.2014.– На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је Одлука о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Сање Ж. Грбавчић, дипл. инж. технологије, под називом „Производња микробних липаза и протеаза као адитива у формулацијама детергената“.

Одлуком Наставно-научног већа одржаног 07.02.2008. године, кандидат прелази са магистарских на докторске студије Технолошко-металуршког факултета на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Зорица Кнежевић-Југовић, ред. проф.). Наставно-научно веће одржано 26.09.2013. године једногласно је донело одлуку о

давању сагласности за продужење рока за завршетак докторских студија студента Сање Ж Грбавчић за још два семестра.

1.2. Научна област дисертације

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

1.3. Биографски подаци о кандидату

Сања Ж. Грбавчић, дипл. инж. рођена је 26.09.1980. године у Београду. Основну школу завршила је у Београду, као и V београдску гимназију са одличним успехом. Студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду започела је школске 1999/2000. године, а дипломирала на смеру Биохемијско инжењерство и биотехнологија 2006. године са просечном оценом 8,11. Дипломски рад под називом "Оптимизација поступка продукције липаза помоћу квасаца" одбранила је са оценом 10,00.

Школске 2006. год. уписала је магистарске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета. Одлуком Наставно-научног већа одржаног 07.02.2008. прелази са магистарских на докторске студије Технолошко-металуршког факултета на истом студијском програму. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија, укључујући и завршни испит са просечном оценом 10,00.

Од јуна 2006. године Сања Грбавчић је као истраживач-приправник била запослена на пројекту БТХ1008- „Додаци храни добијени биотехнолошким путем“ који је у периоду 2004-2007 године финансирало Министарство науке и заштите животне средине Републике Србије у оквиру „Националног програма биотехнологије и агроиндустрије“. Од априла 2008. је била запослена на пројекту технолошког развоја ТР 20064- „Развој биотехнолошких поступака за производњу адитива и нових формулација за прехранбену индустрију“ који финансира Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије. Звање истраживача сарадника стиче 2009. године.

Од 01.01.2011. године је запослена као истраживач сарадник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета на пројекту Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије бр. ИИИ 46010 под називом "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности".

Чита, пише и говори енглески и француски језик.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Сање Грбавчић написана је на 167 страна, са укупно 10 поглавља, 71 слика, 12 табела и 222 литературна навода. Докторска дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак и Литературу, уз изводе на српском и енглеском језику, као и један прилог.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације дата су основна разматрања значаја примене ензима као адитива у детергентима. Приказани су основне предности примене ових адитива првенствено са еколошких аспекта у односу стандардне формулације базиране на токсичним и слабо разградивим хемијским материјама. Такође је представљено тренутно тржишно и индустријско стање у овој области. На крају поглавља су представљени циљеви рада са планом истраживања.

У **Теоријском делу** је направљен је преглед компонената савремених формулација за чишћење укључујући површински активне материје (анјонске, катјонске, амфотерне и нејонске), оксидационе агенсе, пуниоце, ензиме, блок побољшивача и друге. Детаљно је описан развој формулација за чишћење са освртом на развој специфичних компонената у њиховом саставу. Посебан осврт је направљен на својства и примену различитих типова ензима који се последњих деценија користе у средствима за чишћење. Захваљујући великој активности ензима при малим концентрацијама, којима се постижу изузетни ефекти у уклањању различитих типова нечистоћа, ензими су нашли своју позицију као незаменљиви адитиви у производњи детергената. Наведени су типови ензима који се укључују у формулације у погледу реакција које катализују, односно онечишћења на које делују, као и основни захтеви у погледу њихових својстава који обезбеђују потребну функционалност за задату апликацију. Детаљно су описани ензими који су ближа тема дисертације, и то микробне липазе и протеазе. Представљене су важне карактеристике ових ензима укључујући њихову специфичност, као и структуру и механизам деловања. Изложене су и области њихове индустријске примене где је посебан осврт направљен на њихову примену у индустрији детергената. Направљен је детаљан преглед комерцијалних ензима за ову намену, као и детаљан преглед литературе која описује тренутно стање у области нових биокатализатора за ову намену. Такође, наведени су основни механизми биосинтезе ензима, као и основни принципи микробне производње, регулаторни механизми, утицаји различитих процесних параметара и састава хранљиве подлоге на производњу ензима.

Експериментални део се састоји од два поглавља: Материјали и Методе. У првом поглављу наведени су сви материјали коришћени у овим истраживањима. У другом поглављу наведене су методе и услови који су коришћени у експерименталном раду, према редоследу експерименталног истраживачког рада. Прво су описани услови и методе за изоловање микробних врста које производе жељене ензиме техником узгајања на селективним агарима. Даље су описани ферментациони параметри и подлоге које су коришћене са циљем да се липазе и протеазе произведу у одговарајућем приносу. Описане су процедуре коришћене за квантитативно утврђивање ензимске активности, као и утицаја температуре и рН на активности произведених липаза и протеаза. Наведени су стандардни микробиолошки и генетички тестови и процедуре по којима је извршена поуздана идентификација изолата микроорганизама који показују добру продуктивност. Даље су наведени услови под којима је утврђивана применљивост произведених ензима као адитива у детергентима. У том смислу, праћена је стабилност липаза и протеаза у формулацијама које се разликују по типу и садржају активних материја под приказаним условима. Даље су наведени поступци и методе по којима је оптимизован састав формулација детергената на бази ензима, као и начини утврђивања њихове ефикасности применом методе засноване на промени боје и светлине третираних површина квантификованих рефлексноном спектроскопијом.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду у овој дисертацији, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са резултатима добијених у радовима из литературе у различитим или сличним испитаним системима. Резултати и дискусија се састоје од девет поглавља: Примарна селекција микробних продуцената липазе на селективним медијумима, Испитивање кинетике микробног раста и биосинтезе липаза у течним подлогама, Температурни и рН профили произведених ензима, Испитивање способности микроорганизама за продукцију екстрацелуларних протеаза,

Кинетика производње ензима и његова основна својства, Идентификација микробних продуцента липаза за детергенте, Ензими из *Pseudomonas aeruginosa* san-ai као адитиви у детергентима, Липаза из *Pseudomonas putida* B-21 као адитив у детергентима, Оптимизација састава формулације ензимског препарата за чишћење и Оптимизација производње ензима који су показали најбоља својства за примену у детергентима. У **првом поглављу** представљен је одабир микробних сојева који показују потенцијал за продукцију липаза на основу показаних активности на селективним агарима који садрже триглицериде различитог састава. Наредна два поглавља (**друго и треће поглавље**) обухватило је испитивање могућности добијања ензима техником ферментације у течним хранљивим подлогама помоћу изабраних сојева који су показали добру активност на селективним агарима. Добијени ензими су затим примарно окарактерисани како би се утврдила могућност њихове примене у детергентима. Са тог аспекта, неопходно је да ензим буде стабилан и активан у алкалним условима и температурама које су карактеристичне за процес прања. Следеће поглавље је обухватило испитивање способности изабраних сојева да продукују протеазе узгајањем на селективном млечном-казеин агару, а затим и кинетику производње протеазе и њихову примарну карактеризацију помоћу изабраних микроорганизама. **Пето поглавље** је обухватило поуздану идентификацију соја који је одабран као један од радних микроорганизама будући да је у питању природни изолат из отпадног машинског уља. Одређене су његове таксономске карактеристике, а извршено је и секвенционисање гена којим је кодирана синтеза 16S РНК. Добијена секвенца је упоређена са секвенцама у оквиру NCBI стандардне базе, на основу чега је потврђено да изолат који показује највећи потенцијал за ову намену припада *Pseudomonas aeruginosa* врсти. **Шесто поглавље** је обухватило испитивање стабилности липазе и протеазе које продукује овај сој у условима релевантним за примену у детергентима. У том смислу, испитана је стабилност продукованих ензима у присуству великог броја површински активних материја, оксидационих агенаса и комерцијалних детергената. Наредно поглавље (**седмо**) је обухватило испитивање липазе *Pseudomonas putida* B-21 са истог аспекта како би се потврдила и упоредила апликативна вредност произведених ензима за задату апликацију. Применљивост добијених резултата потврђена је у **осмом поглављу** које је обухватило серију експеримената која су имала за циљ да се развију нови еколошки детергенти базирани на произведеним липазама који показују високу ефикасност у уклањању масних онечишћења. Састав формулација је оптимизован коришћењем планираних експеримената, тј. ротатабилног композиционог експерименталног плана. За обраду података је коришћена методологија одзивних површина. Ова статистичка метода планирања експеримената омогућила је да се уз мали број експеримената истовремено сагледају и интеракције испитиваних параметара у посматраном опсегу. Испитивани параметри су изабрани на основу прелиминарних експеримената који су имали за циљ да се утврде ефекти одмашћивања формулација на бази неколико површински активних материја, које не показују инхибиторно дејство на продуковану липазу. Ове формулације су испитане и са аспекта квалитета отпадних вода од прања. На основу ових испитивања, састав формулација изабраних са аспекта ефикасности уклањања масних флека и еколошког аспекта је даље оптимизован при чему су варирана четири параметра на пет нивоа и то: концентрације две изабране нејонске површински активне материје (Lutensol® XP80 и Triton® X-100), pH формулације и концентрација произведеног ензима. Статистичка анализа је показала да је највећи утицај pH, а затим концентрације ензима на ефикасност дате формулације у уклањању масних мрља. Концентрације површински активних материја показују инетересантну међусобну инетакцију, са негативним коефицијентом корелације па би будуће формулације требало базирати на једном, а не комбинацији испитиваних сурфактаната. Резултати су упоређени и продискутовани. Предложено је неколико високо ефикасних формулација за различите намене. Како је највећи степен одмашћивања постигнут у високоалкалним условима, уколико намена, односно природа третираних површина дозвољава употребу високоалкалних формулација, pH би требало држати у вредностима

изнад рН 10. Будући да трошкови за производњу ензима имају највећи удео у укупним трошковима неког ензимског процеса, они представљају највећи фактор ограничене примене ензима у индустрији. Због тога је посебно поглавље (**девето поглавље**) посвећено испитивању могућности повећања приноса ензима у току његове производње из *Pseudomonas aeruginosa* san-a1. Испитани су утицаји различитих параметара, који показују позитивне ефекте на регулацијске механизме биосинтезе ензима, како би се одредили оптимални параметри продукције ензима. У том смислу је показано да је производња липазе из *Pseudomonas aeruginosa* san-a1 индукована додатком одређених масних супстанци у хранљиву подлогу. Као оптимални индуктор се показало сунцокретоу уље имајући у виду цену и остварено повећање продукције ензима. Додатна оптимизација састава ферментационе подлоге и параметара продукције показала је да је температура на којој се изводи ферментација један од најбитинијих фактора који утичу на регулацију механизма биосинтезе. Показано је да се висока протеолитичка активност може остварити ферментацијом у медијуму који је обogaћен Тритон® X-100 (0.12% w/v) при чему се процес производње треба водити на 32 °C. Ниже температуре (20 °C) и суплементација сунцокретовим уљем погодују биосинтези липазе.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Савремени детергенти су комплексне смеше које садрже површински активне материје (ПAM), омекшиваче, оксидационе агенсе и различите ензиме. Како свест о заштити животне средине расте, тако и формулације детергената које садрже ензиме великом брзином замењују конвенционалне хемијске формулације које садрже слабо разградиве, корозивне и токсичне материје. Формулације са инкорпорираним ензимима данас чине преко 80% доступних детергената на тржиштима Европе, Сједињених Америчких Држава и Јапана. Ензими се сматрају еколошки прихватљивим адитивима јер су биодеградабилни, а како се њиховом употребом може повећати ефикасност чишћења, могуће је смањити количине агресивних супстанци у формулацијама за чишћење као и постићи уштеде енергије јер се процес прања може вршити при нижим температурама. Према проценама водећих светских произвођача ензима, смањењем температуре прања са 40 °C на 30 °C остварила би се уштеда енергије од преко 30% по једном циклусу прања, што би на годишњем нивоу на подручју читаве Европе представљало уштеду од преко 4 милијарди kWh. Ова уштеда енергије би тако посредно допринела смањењу емисије CO₂ за 150-450 г по једном циклусу прања, што на нивоу Европе представља годишњи потенцијал уштеде од 12 милиона тона CO₂. Имајући ово у виду, јасно је да је утицај на животну средину који се остварује имплементацијом ензима у формулације за чишћење многострук. Осим значаја питања емисије CO₂ у контексту глобалне борбе против климатских промена, укључивање ензима у формулације детергената омогућава смањење удела слабо разградивих једињења проузрокујући на тај начин и значајно смањење токсичности отпадних вода.

На данашњем нивоу, преко 30% тржишта ензима управо представљају ензими намењени детергентима, и то пре свега протеазе, амилазе, липазе и целулазе. Међутим, нису сви ензими погодни за употребу у формулацијама детергената. Поред тога што њихова производња мора бити економична, ензими који се користе у формулацијама детергената морају да буду стабилни у присуству агенаса који често имају инхибиторно или деактивирајуће дејство. Потреба за новим ензимима бољих перформанси за примену у детергентима, као и недоступност информацијама због коришћења патената, довела је да потрага за новим микробним продуцентима ензима буде у жижи научног и истраживачког интересовања и индустријског развоја.

Управо из тих разлога, у овој докторској дисертацији ће се извршити испитивање различитих нових и комерцијалних микробних сојева са аспекта продукције екстрацелуларних липаза и протеаза. На основу утврђених својстава добијених ензима, размотриће се њихова примена у индустријским процесима, односно испитаће се њихова активност и стабилност у условима релевантним за конкретан процес, где ће се највећи део пажње посветити могућности примене ових ензима као адитива у индустрији детергената. Могућност примене добијених липаза и протеаза као адитива у детергентима ће обухватити испитивања активности и стабилности добијених ензима у присуству различитих површински активних материја, оксидујућих агенаса и дезинфицијенаса при различитим концентрацијама и температурама са циљем развоја нових ензимских формулација детергената.

Селектовани ензими су примењени у формулацији неколико нових производа који показују задовољавајућа својства са становишта ефикасности чишћења у процесу прања, стабилности при складиштењу и састава отпадних вода од прања. У циљу одређивања оптималних својстава ензимске формулације детергената, њен састав је оптимизован методом одзивних површина (RSM) узимајући у обзир еколошке аспекте као и показану ефикасност у уклањању масних онечишћења. Даља оптимизација продукције ензима дефинисала је саставе подлога и процесне параметре којима се модификују регулаторни путеви биосинтезе ензима са циљем повећања приноса селектованих липаза и протеаза. Да би се проценио утицај различитих фактора на принос ензима примењена је метода вишефакторних експерименталних планова (централни композициони ротатабилни план), која омогућава да се да утврди утицај неколико фактора истовремено, те да се одреди интензитет тих утицаја као и њихова могућа интеракција.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру докторске дисертације цитирано је 207 литературних навода који су омогућили да се прикаже стање у испитиваној области, као и актуелност проблематике. Савремена истраживања објављена у наведеним научним радовима су описана, анализирана и продискутована и изведени су закључци који су омогућили добар увид у области примене ензима у овој области индустрије. На основу овог пресека стања у литератури изложене су основне смернице за истраживања која су извршена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из пописа литературе која је коришћена у истраживању, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати у оквиру ове дисертације су доказани одговарајућим експериментима, као и савременим аналитичким инструменталним мерењима према оригиналним или модификованим методама из литературе.

Стандардна активност липаза је одређивана спектрофотометријском методом при чему се користио *p*-нитрофенил-палмитат као супстрат. Активност протеолитичких ензима је такође одређивана спектрофотометријском методом којом је праћен ток хидролизе азоказеина, тј. казеина хемијски модификованог сулфанилном бојом.

У раду је испитан велики број микроорганизама са аспекта производње липаза и протеаза за примену у детергентима, пре свега из колекције култура Технолошко-металуршког и

Медицинског факултета, Универзитета у Београду. Примарна селекција је извршена на основу показаних активности на трибутирин агру као селективним медијумом и као добри продуценти липаза издвојили су се следећи микроорганизми: *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095, *Pseudomonas aeruginosa* san-ai, *Pseudomonas putida* NRRL B-21, *Candida utilis* TMF, *Candida rugosa* NRRL Y-95, *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 и други. Након примарне селекције соја продуцента, изабрани сојеви су потом узгајани на хранљивом агару обогаченим са маслиновим уљем и индикатором Rhodamine B. На основу појаве флуоресцирајућих и наранџастих зона око израслих колонија видљивих након осветљавања под УВ светлошћу, потврдило се који микроорганизми су прави продуцент липазе, а затим је извршена њихова поуздана идентификација секвенционисањем 16S rRNA кодирајућег гена. Изабрани микроорганизми су испитани и са аспекта производње екстрацелуларних протеаза, узгајањем сојева на млечном казеин агру. Микроорганизми који су оцењени као потенцијални добри продуценти липаза и протеаза испитани су са аспекта биосинтезе ових ензима у течним медијумима под различитим условима. Кинетика биосинтезе ензима у току субмерзне ферментације праћена је преко укупне липолитичке и протеолитичке активности, садржаја протеина (одређена методом по Лорију (Lowry)) и праћена је кинетика раста микроорганизма класичним микробиолошким методама. Испитани су утицаји различитих параметара, који показују позитивне ефекте на регулацијске механизме биосинтезе ензима, како би се одредили оптимални параметри њихове продукције, статистичким методама планираних експеримената.

Оптимизација састава формулације детергента базираног на примени добијених ензима и површински активних материја, за које је утврђено да немају инхибиторан/деактивирајући ефекат, вршена је методом планираних експеримената, која се заснива на истовременој промени већег броја параметара, али у складу са претходно одабраним експерименталним планом што омогућује поузданију оптимизацију процесних параметара у ширем интервалу уз значајно смањење броја експеримената и потрошње хемикалија. Поред тога, статистички метод омогућује добијање одговарајућих математичких модела на основу којих може да се предвиди понашање система у зависности од процесних параметара и омогући поуздана контрола и регулација процеса. Сама ефикасност формулације је оцењивана на основу показане способности одмашћивања памучних тканина, а ниво ефикасности је одређиван методом рефлексационе спектроскопије. Вишепараметарска анализа добијених резултата извршена је коришћењем статистичког и математичког програмског пакета MATLAB. Овакав експериментални приступ користио се и приликом оптимизације производње липаза и протеаза помоћу одабраног производног микроорганизма, *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. Након примарне селекције и његове поуздане идентификације секвенционисањем 16S rRNA кодирајућег гена, испитани су утицаји параметара који показују позитивне ефекте на регулацијске механизме биосинтезе ензима. Постоје два основна регулацијска механизма којима је одређен ниво продукције ензима: репресија лако искористивим изворима угљеника/азота и индукција супстратима и/или аналогом супстрата. Сходно томе, пажљивим избором састава хранљиве подлоге и услова култивације може се утицати на регулацијске механизме и повећати принос ензима. Стога, након прелиминарних квалитативних одабира ефикасних индуктора и стимулатора производње липаза и протеаза, извршена је квантитативна оптимизација састава хранљиве подлоге применом метода планираних експеримената. Статистичком обрадом добијених експерименталних података процењени су утицаји појединачних фактора, као и њихови међусобни ефекти на биосинтезу липаза и протеаза.

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа до сада објављених експерименталних података и резултата приказаних у оквиру ове докторске дисертације остварен је значајан допринос у развоју нових еколошких

детергената са имплементираним ензимима који су произведени из сопствених сојева и по сопственој технологији. У оквиру тезе селектовани су нови микроорганизми који производе биокатализаторе који показују велики потенцијал за комерцијалну примену у овој области. Дефинисани су оптимални параметри и састав биодетергената базираних на произведеним ензимима који обезбеђују високо ефикасно одмашћивање уз смањени ризик за животну средину. Оптимизација ферментационих процесних параметара је омогућила сагледавање законитости које имају круцијалне ефекте на генетичку регулацију синтезе ензима. Модификација регулаторних путева биосинтезе ензима је омогућила добијање ензимских препарата задовољавајућих приноса и састава смеше ензима.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Сања Грбавчић је дипломирани инжењер технологије. Током израде докторске дисертације испољила је заиста изузетну стручност у реализацији експеримената и коришћењу различитих техника и метода, а при анализи резултата је показала самосталност, систематичност и креативност. Кандидат има изузетну склоност ка експерименталном раду и инжењерски приступ у развоју и реализацији експерименталних техника. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Допринос резултата ове тезе може се посматрати са следећих становишта:

- Испитивање раста великог броја микроорганизма на селективним медијумима издвојило је потенцијалне продуcente липаза и протеаза из колекција култура Технолошко-металуршког и Медицинског факултета Универзитета у Београду, међу којима се налазе природни изолати, као и комерцијално доступни микробни сојеви.
- Утврђене су кинетике раста микроорганизма и продукције ензима за селектоване сојеве. Примарна селекција је издвојила три ензима који показују жељена својства за примену у детергентима. Добијена липаза из *Pseudomonas putida* B-21 и липаза и протеаза из *Pseudomonas aeruginosa* san-ai су испитане и са аспекта стабилности у присуству површински активних материја, оксидационих агенаса и комерцијалних детергената, чиме се потврдила применљивост добијених ензима као адитива у формулацијама детергената.
- Испитана је ефикасност уклањања масних мрља неколико формулација на бази липазе из *Pseudomonas aeruginosa* san-ai и површински активних материја које нису показале изражени денатуришући ефекат. У зависности од типа површински активне материје и концентрације, постигнуто је уклањање и до 80% масноће. Ензимска формулација детегената је оптимизована методом статистички планираног експеримента. Узимајући у обзир еколошке аспекте као и показану ефикасност, најбољи ефекти одмашћивања постижу се у формулацији која поред ензима садржи ниску дозу Lutensol® XP 80 (0,4%).
- Оптимизација продукције ензима методом статистички планираног експеримента дефинисала је саставе подлога и процесне параметре којима се модификују регулаторни путеви биосинтезе ензима са циљем повећања приноса липаза и протеаза. Висока протеолитичка активност се тако може остварити ферментацијом у медијуму који је обогаћен Тритон® X-100 (0,12%) при чему се процес производње треба водити на 32 °C.

Ниже температуре (20 °C) и суплементација сунцокретовим уљем погодују биосинтези липазе.

- Развијено је неколико ефикасних поступака изолације и пречишћавања ензима из ферментационих течности и извршена је делимична карактеризација произведених липаза и протеаза (pH и температурни профил, утицај различитих јона метала и инхибитора на активност) што указује на области индустријске примене ових ензима;

- Формулисано је неколико нових производа на бази липаза и протеаза који показују задовољавајућа својства са становишта ефикасности чишћења у процесу прања, стабилности при складиштењу и састава отпадних вода од прања у поређењу са комерцијалним хемијским детергентима.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне литературе која разматра применљивост ензима у индустрији детергената, као и разматрањем резултата истраживања добијених применом одабране методологије у овој докторској дисертацији, може се уочити да својства добијених ензима у потпуности задовољавају неопходне услове за апликацију у овој области. Имајући у виду да стабилност произведених ензима у присуству великог броја агенаса коришћених у формулацијама детергената превазилази стабилност комерцијално доступних ензимских препарата за ову намену, као и показану ефикасност формулација у којима су имплементирани произведени ензими, резултати ове докторске дисертације дају несумњиви научни и апликативни значај и представљају значајан корак ка практичној примени ензима у овој области. Такође је значајно нагласити да су оптимизацијом састава предложених ензимски базираних формулација развијени нови производи који значајно умањују негативне утицаје отпадних вода на животну средину.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Сања Грбавчић је резултате свог истраживања током израде ове дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног и националног значаја и саопштавањем радова на међународним и националним скуповима. Резултати досадашњег научно-истраживачког рада кандидата у овој области приказани су у 5 (пет) радова објављених у научним часописима међународног значаја (ознака групе M20: врста резултата M21-1 рад; M23-4 рада), 4 (четири) рада објављених у зборницима скупова међународног значаја штампана у целини (ознака групе M30: врста резултата M33, 4 рада), 12 (дванаест) радова објављених у зборницима скупова националног значаја (ознака групе M60: врста резултата M63, 12 радова) и једног награђеног патента.

Категорија M21:

1. S. Ž. Grbavčić, D. I. Bezbradica, L. T. Izrael-Živković, N. S. Avramović, N. B. Milosavić, I. M. Karadžić, Z. D. 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).

Категорија M23:

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

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

3. Milena R. Bradić, Nevena D. Ognjanović, Dejan I. Bezbradica, **Sanja Ž. Grbavčić**, Nataša S. Avramović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, „Enzimaska sinteza monoacilglicerola“, *Hemijska Industrija*, **64(5)** (2010) 375-388. (ISSN: 0367-598X; **IF(2011) 0,205**; 120/133 Engineering, Chemical).

4. 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* **67(4)** (2013) 677-685 (ISSN: 0367-598X; **IF(2012) 0,463**; 104/133 Engineering, Chemical).

Kategorija M33:

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, *Proceedings of the 35th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, ISBN: 978-80-227-2903-1, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 26-30 May, 2008, pp. 230-1-230-6.

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“, *Proceedings of the 36th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, ISBN 978-80-227-3072-3, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 25-29 May, 2009, pp. 153-1 - 153-9.

3. Jakovetić Sonja, Bezbradica Dejan, Avramović Nataša, Milosavić Nenad, **Grbavčić Sanja**, Karadžić Ivanka, Knežević-Jugović Zorica, „Optimization of rhamnolipid and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology, *Proceedings of the 36th International Conference of SSCHE*, ISBN 978-80-227-3072-3, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 25-29 May, 2009, pp. 220-1-220-7.

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“, *Proceedings of the 39th International Conference of SSCHE*, J. Markoš, ed., Tatranské Matliare, Slovakia, May 21-25, 2012, pp 1433-1438, ISBN 978-80-89475-04-9.

Kategorija M 63:

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., Zbornik radova, str. 53-56.

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., Zbornik radova, str. 33-42.
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., Zbornik radova, str. 51-54.
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., Zbornik radova, str. 168-171.
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., Zbornik radova, str. 192-195.
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., CD radova u celini, ISBN: 978-86-7401-269-7, str. 49-52.
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., CD radova u celini, ISBN: 978-86-7401-269-7, str. 37-40.
8. 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., CD radova u celini, ISBN: 978-86-7401-269-7, str. 53-57.
9. 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, Tehnološki fakultet, Kragujevac, 13-14. maj 2011., knjiga radova, str. 151-155.
10. 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 PIO5, 54-57.
11. 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.

Награде и признања:

1. **С. Грбавчић**, Н. Аврамовић, Д. Безбрадица, Н. Милосавић, Д. Мијин, И. Карацић, З. Кнежевић-Југовић, Сребрна медаља за нове технологије за: „Ензимска формулација за чишћење тканина, радних површина и опреме у прехранбеној индустрији“, 30. Међународна изложба проналазака, нових технологија и индустријског дизајна „Проналазаштво, Београд, 2010“.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Сање Грбавчић, дипл. инж. под називом „Производња микробних липаза и протеаза као адитива у формулацијама детергената” сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на међународним и националним конференцијама. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да се докторска дисертација под називом „Производња микробних липаза и протеаза као адитива у формулацијама детергената” кандидата Сање Грбавчић прихвати, изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Дејан Безбрадица, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Сузана Димитријевић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Иванка Карацић, редовни професор
Универзитет у Београду, Медицински факултет

