

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Младена Михаиловића, дипл. инж. технологије, за израду докторске дисертације

Одлуком Технолошко-металуршког факултета од 18.12.2014. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Младена Михаиловић, дипл. инж. технологије, а за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **Хемијска модификација површине носача са циљем добијања имобилисаних липаза и галактозидаза повећане активности и стабилности.**

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Младен Михаиловић рођен је 03.10.1981. године у Београду, где је завршио основну школу Јелена Ћетковић и Шесту београдску гимназију. Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписао је школске 2000/2001. године. Дипломирао је на ТМФ-у на Катедри за биохемијско инжењерство и ботехнологију 29.09.2008. са оценом на дипломском раду 10 (десет) и просечном оценом у току студија 8,47. Докторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију под менторством др Дејана Безбрадице уписао је 2010. године.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Младен Михаиловић докторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета, под менторством др Дејана Безбрадице, ван. проф., уписао је 2010. године. Положио је све испите предвиђене планом и програмом последипломских студија Технолошко-металуршког факултета у Београду са просечном оценом 9,73 укључујући и завршни испит. Следи списак положених испита са бројем остварених ЕСПБ бодова:

Предмет	ЕСПБ	Оцена
1. Одабрана поглавља математичке анализе	5	9
2. Хемијска кинетика	5	8

3. Одабрана поглавља биохемије - витамини	5	10
4. Биохемијска кинетика	5	10
5. Индустриска микробиологија	5	10
6. Електрохемијски и алтернативни извори електричне енергије	5	10
7. Структурна анализа органских молекула	6	10
8. Имобилисани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	6	10
9. Површински активне материје	4	10
10. Биоактивне материје у козметичким производима	4	10
11. Енглески језик	0	10
12. Завршни испит	30	10

На седници Наставно-научног већа Технолошко металуршког факултета од 18.12.2014. именована је Комисија за оцену подобности теме и кандидата Младена Михаиловића за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **Хемијска модификација површине носача са циљем добијања имобилисаних липаза и галактозидаза повећане активности и стабилности.**

Од 1.02.2011. године, Младен Михаиловић је запослен као истраживач приправник на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду. У звање истраживач приправник изабран је 2010. а у звање истраживач сарадник 2012. године. У текућем пројектном циклусу (од 2011. године) ангажован је на пројекту „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ ев. бр. ИИИ 46010. Коаутор је девет радова у часописима међународног значаја (пет М21 и четири М23) и десет саопштења на домаћим и међународним скуповима (пет М34, три М63 и два М64).

Објављени научни радови и саопштења

Научни радови у врхунским међународним часописима (М₂₁)

1. Bezbradica D., Mijin D., Mihailović M., Knežević-Jugović Z.: *Microwave-assisted immobilization of lipase from Candida rugosa on Eupergit® supports*, - Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol 84, No 11, 2009, pp. 1642-1648, ISSN 0268-2575, IF (2009)=2,045
2. Bezbradica D., Stojanović M., Veličković D., Dimitrijević A., Carević M., Mihailović M., Milosavić N.: *Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid*

- to liposoluble vitamin C ester*, - Biochemical Engineering Journal, Vol 71, 2013, pp. 89-96, ISSN 1369-703X; IF(2011)=2,645; IF(2012)=2,579; IF(2013)= 2,368.
3. Mihailović M., Stojanović M., Banjanac K., Carević M., Prlainović N., Milosavić N., Bezbradica D.: *Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization*, -Process Biochemistry, Vol 49, No 4, 2014, pp. 637-646, ISSN: 1359-5113; IF(2012)=2,414; IF(2013)=2,524.
 4. Milisavljević A., Stojanović M., Carević M., Mihailović M., Veličković D., Milosavić N., Bezbradica D.: *Lipase-Catalyzed Esterification of Phloridzin: Acyl Donor Effect on Enzymatic Affinity and Antioxidant Properties of Esters*, - Industrial and Engineering Chemistry Research, Vol 53, No 43, 2014, pp. 16644–16651, ISSN: 0888-5885; IF (2012)=2,206; IF (2013)=2.235.
 5. Banjanac K., Mihailović M., Prlainović N., Stojanović M., Carević M., Marinković A., Bezbradica D.: *Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase*, - Journal of Chemical Technology and Biotechnology, in press, DOI: 10.1002/jctb.4595, 2014, Online ISSN: 1097-4660; IF(2012)=2,504; IF(2013)=2,494.

Научни радови у међународним часописима (M₂₃)

6. Stojanović M., Carević M., Mihailović M., Knežević-Jugović Z., Petrović S., Bezbradica D.: *Enzimaska sinteza i primena askorbil-estara masnih kiselina*, - Hemijska Industrija, Vol 67, 2013, pp. 239-247, ISSN 2217-7426; IF(2011)=0,205; IF(2012)=0,463, IF(2013)=0,562.
7. Mihailović M., Knežević-Jugović Z., Mijin D., Bezbradica D.: *Optimizacija esterifikacione aktivnosti lipaze iz Candida rugosa imobilisane mikrotalasnim zračenjem*, - Hemijska Industrija, Vol 66, 2012, pp. 9-19, ISSN 2217-7426, IF(2012)=0,205; IF(2013)=0,463.
8. Carević M., Vukašinović-Sekulić M., Grbavčić S., Stojanović M., Mihailović M., Dimitrijević A., Bezbradica D.: *Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria*, - Hemijska Industrija, DOI: 10.2298/HEMIND140303044C, ISSN 2217-7426; IF(2011)=0,205; IF(2012)=0,463; IF(2013)=0,562.
9. Stojanović M., Carević M., Mihailović M., Veličković D., Dimitrijević A., Milosavić N., Bezbradica D.: *Influence of fatty acid on lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl esters and their free radical scavenging capacity*, - Biotechnology and Applied Biochemistry (2014), DOI: 10.1002/bab.1296. Online ISSN: 1470-8744; IF (2012)=1,348; IF (2013)=1,322.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M₃₄)

10. Milisavljević A., Stojanović M., Dinić I., Carević M., Mihailović M., Milosavić N., Bezbradica D.: *Lipase-catalyzed synthesis of phloridzin esters*, - Proceedings of the 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013., pp. 254, ISBN 978-86-7132-053-5.
11. Carević M., Stojanović M., Mihailović M., Stefanović A., Grbavčić S., Knežević-Jugović Z., Bezbradica D.: *The immobilization of β -galactosidase on chemically modified immobilization supports*, - Proceedings of the 2nd FCUB Workshop Food Technology and Biotechnology, Beograd 2011., pp. P-26 .
12. Prlainović N., Stojanović M., Carević M., Mihailović M., Banjanac K., Marinković A., Bezbradica D.: *Two-step modification of silica nanoparticles for covalent lipase immobilization*, - Proceedings of the 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013., pp. 178, ISBN 978-86-7132-053-5.
13. Mihailović M., Carević M., Stojanović M., Prlainović N., Banjanac K., Bezbradica D.: *Chemical modification of Purolite A109 for application in lipase immobilization*, -

Proceedings of the 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013., pp. 267, ISBN 978-86-7132-053-5.

14. Carević M., Vukašinović-Sekulić M., Stojanović M., Mihailović M., Jakovetić S., Grbavčić S., Bezbradica D.: *Production and characterization of extracellular α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* DSM 1862*, - Proceedings of the 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013., pp. 247, ISBN 978-86-7132-053-5.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M₆₃)

15. Stojanović M., Carević M., Jakovetić S., Dimitrijević A., Trbojević J., Mihailović M., Veličković D.: *Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate*, - Zbornik radova sa Prve konferencije mladih hemičara Srbije, Beograd 2012., str. 64-67., ISBN: 978-86-7132-051-1.
16. Jakovetić S., Carević M., Grbavčić S., Stojanović M., Luković N., Žuža M., Mihailović M.: *Esterification of phenolic acids catalyzed by lipase B from *Candida antarctica**, Zbornik radova sa Prve konferencije mladih hemičara Srbije, Beograd 2012., str. 54-57., ISBN: 978-86-7132-051-1.
17. Mihailović M., Banjanac K., Stojanović M., Prlainović N., Jakovetić S., Carević M.: *Stabilizacija imobilisane lipaze iz *Candida rugosa* tretmanom imobilizata aminokiselinama*, Zbornik radova sa Prve konferencije mladih hemičara Srbije, Beograd 2012., str. 82-85., ISBN: 978-86-7132-051-1.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M₆₄)

18. Carević M., Stojanović M., Jakovetić S., Mihailović M., Dimitrijević A., Trbojević J., Veličković D.: *Proizvodnja sirovog ćelijskog ekstrakta β -galaktozidaze pomoću bakterija mlečne kiseline*, Knjiga kratkih izvoda radova sa Prve konferencije mladih hemičara Srbije, Beograd 2012., str. 74, ISBN: 978-86-7132-051-1.
19. Mihailović M., Prlainović N.: *Modifikacija površine nano-SiO₂ čestica za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa**, Knjiga kratkih izvoda radova sa Prve konferencije mladih hemičara Srbije, Beograd 2012., str. 99, ISBN: 978-86-7132-051-1.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија и у оквиру научно-истраживачког рада на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, ИИИ46010 (2011-2014.), Младен Михаиловић, дипл. инжењер технологије, показао је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Такође, тема докторске дисертације припада области имобилизације ензима којом се кандидат бавио и током израде дипломског рада из којег је проистекао један рад у врхунском међународном часопису (M21) којег је коаутор, а током израде дисертације објавио је као први аутор један рад у врхунском међународном часопису (M21), један рад у часопису међународног значаја (M23), једно саопштење са скупа међународног значаја (M34), једно саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M63) и једно саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64) што упућује на закључак да је кандидат врло компетентан за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет и циљ истраживања ове докторске дисертације је добијање нових имобилисаних ензимских препарата липазе, α - и β -галактозидазе који ће у односу на постојеће препарате

имати повећану активност, стабилност или селективност. Фокус ове дисертације биће на побољшању процеса имобилизације ензима, и то у оквиру следећих експерименталних целина: 1) добијање нових носача за имобилизацију ензима применом различитих метода хемијске модификације површине неорганских и органских честица погодних механичких карактеристика, 2) побољшање постојећих носача за имобилизацију применом хемијских модификација, 3) оптимизација услова модификације носача и имобилизације ензима, 4) примена пост-имобилизационог третмана са циљем повећања стабилности и активности имобилисаног ензима.

Имобилизација ензима подразумева везивање ензима (физичким или хемијским путем) за површину носача, при чему ензим задржава своју каталитичку функцију. Немогућност изоловања слободног ензима из реакционе смеше и његове поновне употребе у више реакционих циклуса, немогућност примене у континуалним процесима, као и високе цене пречишћавања и издвајања производа, наметнуле су примену имобилисаних ензима као једино рационално решење у процесима на индустријском нивоу. Различити приступи су примењени за имобилизацију ензима, али превладавају имобилизација путем физичке адсорпције ензима на површину носача, као и имобилизација путем стварања правих (ковалентних) веза између функционалних група носача и ензима.

За имобилизацију ензима у пракси су коришћени различити носачи, природни или синтетски, органског или неорганског порекла. Ни један носач не може бити универзално решење, већ се за сваки систем појединачно мора наћи оптимално решење због врло сложеног утицаја расподеле аминокиселинских остатака на површини ензима на процес имобилизације. Оно што карактерише добар носач за имобилизацију ензима јесте избор адекватних функционалних група које могу ступити у интеракцију са функционалним групама ензима, а које су инертне према супстратима, производима реакције и растварачу. Подједнако је важно и да носач има добре механичке особине, оптималну концентрацију функционалних група на површини али и да је његова употреба са економске стране оправдана јер скупи носачи често драстично поскупљују ензимски процес и чине економски неприхватљивим ензимску производњу јефтинијих производа, на пример адитива храни или хемикалија.

Да би се испунио захтев за оптималном концентрацијом реактивних функционалних група на површини носача, у пракси се користе хемијске модификације носача које за циљ имају повећање броја постојећих или увођење потпуно нових функционалних група. Хемијске модификације носача, осим за увођење функционалних група, могу послужити и за увођење „ножице“ (обично угљоводоничне природе) која повећава растојање између функционалне групе и површине носача што резултује смањењем стерних сметњи и смањује вероватноћу везивања ензима у неактивној конформацији. Добрим одабиром методе за модификацију носача може се утицати на стабилност, али и активност имобилисаног ензима. Неки од најчешће коришћених једињења за активацију носача су епихлорхидрин, глутаралдехид, трезил хлорид, цијаноген бромид, етилен диамин и Н-хидрокси-сукцинимид. Одабир модификујућег агенса зависи од физичко-хемијских карактеристика самог носача али и структуре ензима који треба имобилисати. Функционалне групе ензима (бочних ланаца аминокиселина) које интерагују са функционалним групама носача су најчешће ϵ -амино групе (лизин), сулфидрилне групе (цистеин) и карбоксилне групе (аспарагинска и глутаминска киселина).

У овој дисертацији биће изведена модификација различитих органских и неорганских материјала ради њихове примене као носача за имобилизацију, као и модификација постојећих носача за имобилизацију ензима ради промене активности и стабилности ензима који се на њих имобилишу. У почетним фазама истраживања биће примењене различите методе увођења нових функционалних група на површини комерцијалних носача за имобилизацију Eupergit® и Immobead®. Пошто ови носачи имају епоксидне групе на површини, функционизацијом ће бити уведене карбонилне, аминокиселинске или тиосулфонске групе, а активност, стабилност и специфичност ензима имобилисаних на модификован и

немодификован носач ће бити упоређене. У наредној фази фокус истраживања биће на примени јефтиних материјала погодних механичких карактеристика који се функционализацијом могу трансформисати у носаче за ковалентну имобилизацију ензима. На пример, биће коришћен кополимер стирена и дивинил бензена са слабо базном примарном амино групом. Стирен-дивинил бензен је тржишно доступан по ниској цени, а има погодне физичко-хемијске карактеристике за имобилизацију ензима чак и у немодификованом облику. Захваљујући присуству амино група лако се може извршити функционализација, а у овој дисертацији биће испитани епихлорхидрин, цијанурил-хлорид и глутаралдехид као агенси за функционализацију. Такође, биће испитане и различите могућности функционализације површине силикатних материјала. Површина силике биће у првом кораку активирана увођењем амино група у реакцији са аминопропилтетраметоксисиланима, а након тога увођењем епоксидних, хлоридних или карбонилних група применом епихлорхидрина, цијанурил-хлорида и глутаралдехида, редом.

Добијени функционализовани носачи биће анализирани у имобилизацији липаза и галактозидаза. Ови ензими ће бити примењени јер су у досадашњим истраживањима показали различите афинитете по питању хидрофилности површине носача. Липазе су ензими који показују велики афинитет према хидрофобним носачима (често се и активирају имобилизацијом на хидрофобним површинама), док галактозидазе показују много већи афинитет ка хидрофилним носачима. Оваквим избором ензима за тестирање носача за имобилизацију обезбеђује се боље детектовање евентуалних унапређења добијених функционализацијом, а ови ензими имају и велики индустријски значај, нарочито у прехранбеној индустрији. Најбољи ензимски препарати биће примењени у реакторима са пакованим слојем и реакторима са флуидизованим слојем ради испитивања њихове оперативне стабилности у реалним условима примене.

Последњих година објављени су резултати бројних истраживања која се са различитих аспеката баве проблематиком оптимизацијом носача за имобилизацију.

У даљем тексту наведени су само најважнији од њих, који су представљали основу за истраживања и експерименте изведене у оквиру израде ове докторске дисертације:

1. Hermanson G.T.: *Bioconjugate Techniques*, third edition, Academic Press 2013.
2. de Maria P.D., Sánchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., Alcántara A.R.: *Understanding Candida rugosa lipases: an overview*, - *Biotechnology Advances*, Vol 24, No 2, 2006, pp. 180–196.
3. Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O.: *One biocatalyst – many applications: the use of Candida antarctica B-lipase in organic synthesis*, - *Biocatalysis and Biotransformation*, Vol 16, No 3, 1998, pp. 181–204.
4. Sun J., Jiang Y., Zhou L., Gao J.: *Immobilization of Candida antarctica lipase B by adsorption in organic medium*, - *New Biotechnology*, Vol 27, No 1, 2010, pp. 53–58.
5. Silva J.A., Macedo G.P., Rodrigues D.S., Giordano R.L.C., Gonçalves R.L.C.: *Immobilization of Candida antarctica lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies*, - *Biochemical Engineering Journal*, Vol 60, 2012., pp. 16–24.
6. Rodrigues D.S., Mendes A.A., Adriano W.A., Gonçalves R.L.B., Giordano R.L.C.: *Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol 51, No 3-4, 2008., pp. 100–109.
7. Verma M.L., Barrow C.J., Kennedy J.F., Puri M.: *Immobilization of β -galactosidase from Kluyveromyces lactis on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis*, - *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol 50, No 2, 2012., pp. 432–437.
8. Torres P., Batista-Viera F.: *Immobilization of β -galactosidase from Bacillus circulans onto epoxy-activated acrylic supports*, - *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol 74, No 3-4, 2012., pp. 230–235.

9. Costa H.C.B., Romão B.B., Ribeiro E.J., Resende M.M.: *Glutaraldehyde Effect in the Immobilization Process of Alpha-Galactosidase from Aspergillus niger in the Ion Exchange Resin Duolite A-568*, - Chemical Engineering Transactions, Vol 32, 2013., pp. 1105-1110.
10. Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M.: *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*, - Enzyme and Microbial Technology, Vol 26, No 7, 2000., pp. 509-515.
11. Mateo C., Torres R., Fernández-Lorente G., Ortiz C., Fuentes M., Hidalgo A., et al.: *Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method*, - Biomacromolecules, Vol 4, No 3, 2003., pp. 772-777.
12. Chen B., Hu J., Miller E.M., Xie W., Cai M., Gross R.A.: *Candida antarctica lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis*, - Biomacromolecules, Vol 9, No 2, 2008., pp. 463-471.
13. Cruz J.C., Pfromm P.H., Rezac M.E.: *Immobilization of Candida antarctica Lipase B on fumed silica*, - Process Biochemistry, Vol 44, No 1, 2009., pp. 62-69.
14. Bezbradica D.I., Mateo C., Guisan J.M.: *Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde*, - Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol 102, 2014., pp. 218-224.
15. Blanco R.M., Terreros P., Fernández-Pérez M., Otero C., Díez-González G.: *Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: characterization of the support and the catalysts*, - Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme, Vol 30, No 2, 2004., pp. 83-93.
16. Hartmann M., Kostrov X.: *Immobilization of enzymes on porous silicas - benefits and challenges*, - Chemical Society Reviews, Vol 42, 2013., pp. 6277-6289.
17. Bai Y.X., Li Y.F., Yang Y., Yi L.X.: *Covalent immobilization of triacyl-glycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO₂ spheres*, - Process Biochemistry, Vol 41, No 4, 2006., pp. 770-777.

3. Полазне хипотезе

Увидом у актуелну научну литературу, долази се до закључка да је имобилизација ензима од примарног значаја за примену ензима у индустријској пракси. С обзиром да употреба ензима у слободном стању није економски исплатива, а да са друге стране производи добијени ензимским поступцима добијају епитет „зелених“, тј. еколошки прихваћених, све више експерименталних истраживања је усмерено баш на имобилизацију ензима. Липазе и галактозидазе имају велики значај пре свега за индустрију хране, па су због тога постале предмет испитивања великог броја студија. Већина досадашњих истраживања била је усмерена на имобилизацију липаза и галактозидаза путем физичке адсорпције, с обзиром да је то најједноставнији и економски најповољнији вид имобилизације. Иако постоје комерцијални препарати имобилисане липазе адсорпцијом (нпр. Novozyme® 435) који се успешно примењују, у већини случајева адсорпција не задовољава све потребне критеријуме за ширу примену имобилисаних ензима. С тога се све већа пажња посвећује ковалентној имобилизацији, а самим тим и материјалима погодним за везивање ензима. Увођење нових реактивних функционалних група на површину носача, увођење „ножице“ која омогућава мање стерне сметње при имобилизацији, као и промене односа хидрофилних и хидрофобних регија површине само су неке од могућности којима се може утицати на активност, стабилност и селективност имобилисаних липаза и галактозидаза.

Основне хипотезе које се могу издвојити као полазна основа за започињање научно-истраживачког рада у оквиру ове дисертације су следеће:

- Основни предуслов за интензивнију индустријску примену било ког ензима, а самим тим и липаза и галактозидаза, представља могућност имобилизације. Иmobилизација се може сматрати успешном уколико се током имобилизације у потпуности или делимично сачува

каталитичка функција ензима, али и ако се имобилисани ензим покаже стабилнијим од слободног (отпорнији на утицај температуре или органских растварача). Приликом имобилизације ензима може доћи и до промене селективности ензима што је од посебног значаја при добијању вреднијих изомера.

- Правилан избор носача, али и методе и услова имобилизације, од пресудног је значаја за добијање имобилизата оптималних карактеристика. Имобилизација липаза на хидрофобне носаче се у досадашњој пракси показала као веома ефикасна с обзиром да се тиме постиже активација на граници фаза – феномен карактеристичан за липазе. Активни и стабилни препарати имобилисаних липаза могу се добити адсорпцијом, али се подједнако добро могу ковалентно везати за носаче који на својој површини имају функционалне групе попут епоксидних, карбонилних или хлоридних. Са друге стране, галактозидазе показују већу тежњу ка хидрофилнијим носачима.

- Носачи који на својој површини немају функционалне групе које могу интераговати са аминокиселинским остацима ензима, могу се подвргнути реакцијама хемијске модификације, при чему се на површину носача уводе реактивне функционалне групе. У досадашњој пракси најчешће су вршене модификације помоћу епихлорхидрина, глутаралдехида и цијанурил-хлорида. Увођење епоксидних група помоћу епихлорхидрина на површину носача је један од најпогоднијих приступа, с обзиром да уведене епоксидне групе лако могу успоставити везу са аминокиселинским, хидроксилним и сулфхидрилним групама ензима. У досадашњим истраживањима помоћу епихлорхидрина су модификовани носачи са хидроксилним групама на површини, а у овој дисертацији ће бити испитана могућност модификације носача са примарним аминокиселинским групама на површини. Аминокиселинске групе су због своје базности реактивније од хидроксилних и лако могу реаговати са епихлорхидрином, али је неопходно оптимизовати услове реакције, с обзиром на могућност добијања великог броја споредних производа. У том смислу, применом статистичких метода биће испитан утицај најважнијих фактора модификације (температуре, времена трајања реакције и концентрације епихлорхидрина).

- Могућности имобилизације липазе из *Candida rugosa*, липазе типа Б из *Candida antarctica*, α - и β -галактозидазе из *Lactobacillus Acidophilus* као и β -галактозидазе из *Aspergillus oryzae* на немодификоване и модификоване носаче биће утврђена. Поређењем активности и стабилности имобилисаних ензима на различите немодификоване и модификоване носаче може се стећи увид у адекватност одређене методе модификације носача за имобилизацију конкретног ензима. Осим активности, неопходно је одредити и масу везаних протеина да би се могла добити потпуна слика о ефектима модификације неког носача на његов имобилизациони капацитет.

- Како и након имобилизације ензима на површини носача заостаје одређени број непрореагованих активних група, неопходно је спречити могућност даљих нежељених интеракција. У том смислу, највећи потенцијални проблем представљају интеракције непрореагованих епоксидних група носача, па је неопходно извршити њихово блокирање. У досадашњој пракси, непрореаговале епоксидне групе су блокиране етаноламином, а у овом раду ће бити утврђено да ли се карактеристике добијеног имобилисаног ензима могу побољшати уколико се у ову сврху користе аминокиселине.

- У досадашњој пракси за имобилизацију ензима су коришћене честице већих димензија (од 300 μm до неколико милиметара). Иако је примена честица већих димензија оправдана пре свега са становишта употребе у реакторима са пакованим и флуидизованим слојем, честице ових димензија у великом броју случајева имају проблем са дифузионим ограничењима. Из тог разлога као једну од могућности за носач за имобилизацију треба испитати и наночестице силицијум диоксида. Ове честице имају велику контактну површину, немају дифузионих ограничења, а такође се могу модификовати и према потреби могу се увести функционалне групе за везивање ензима. У основи њихова површина је хидрофилна а увођењем различитих функционалних група може се утицати на промену хидрофобности и афинитета за везивање појединих ензима.

4. Научне методе истраживања

Учинак реакција модификације носача биће праћен одређивањем садржаја функционалних група на површини носача и то пре свега волуметријским методама. Поред квантитативне анализе, учинак модификације носача биће проверен и спектроскопском анализом (FT IR). Најзанимљивије реакције модификације биће оптимизоване помоћу статистичког модела - централног композитног ротатабилног планирања (CCRD), а анализа добијених резултата ће бити извршена применом методе одзивних површина (RSM). Маса везаних протеина и активност имобилисаних липаза и галактозидаза биће одређивана стандардним спектрофотометријским методама, а управо подаци о маси везаних протеина и активности служиће за поређење ефеката имобилизације на носаче модификоване различитим методама. Концентрација протеина биће одређивана спектрофотометријским методама по Бредфорду и Лорију, а активност методама хидролизе п-нитрофенил палмитата (*p*-NPP) и п-нитрофенил бутирата (пНПБ) за липазе односно о-нитрофенил-β-Д-галактопиранозида (*o*-NPG) за β-галактозидазу. Активност α- и β-галактозидаза у реакцијама синтезе галактозида биће праћена течном хроматографијом високих перформанси (HPLC) помоћу аналитичке колона за шећере (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺), а детекција производа биће извршена помоћу рефрактометријског детектора (RID). Утицај методе имобилизације и модификације носача за имобилизацију на стереоселективност липаза биће испитана помоћу течне хроматографије високих перформанси са специфичном колоном за раздвајање оптички активних изомера (Astec Chirobiotic V).

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос на пољу примене хемијских модификација носача за имобилизацију липаза и галактозидаза, са циљем добијања максималне активности и стабилности имобилисаних ензима.

Развој метода за хемијску модификацију површине носача може се сагледати кроз неколико појединачних доприноса:

- Избор носача што повољнијих физичких и хемијских карактеристика. Адекватне физичке карактеристике омогућују да не долази до механичких оштећења носача када се имобилисани ензим користи у проточним реакторима са флуидизованим слојем, а адекватне хемијске карактеристике подразумевају првенствено присуство функционалних група на површини носача за имобилизацију које су реактивне према модификујућим агенсима.
- Избор најпогоднијег агенса за модификацију носача намењеног имобилизацији липаза и галактозидаза, са аспекта активности, стабилности и стереоселективности добијеног имобилисаног ензима
- Оптимизација најбитнијих параметара модификације (температура, време реакције, концентрација агенса за модификацију) која омогућава довољну концентрацију функционалних група на површини носача, а да се истовремено избегну нежељене споредне реакције умрежавања које доводе до смањења активности имобилисаног ензима.
- Избор повољних метода и реагенса за постимобилизациони третман имобилисаних ензима, јер се овим третманом, поред примарне улоге блокирања непрореаговалих функционалних група и спречавања нежељених реакција, отвара и могућност мењања хидрофилности површине носача која утиче на активност и стабилност имобилисаног ензима.
- Развој метода за модификацију наночестица као савремених носача за имобилизацију липаза и галактозидаза.

6. План истраживања и структура рада

Предмет истраживања ове дисертације је развој и оптимизација метода хемијске модификације површине носача за имобилизацију са циљем добијања имобилисаних липаза и галактозидаза повећане активности и стабилности. Током израде дисертације биће испитан већи број материјала који се могу користити као носачи за имобилизацију, али и већи број модификујућих агенаса. Хемијске модификације које ће бити примењене треба да омогуће добијање носача богатог реактивним функционалним групама, а самим тим што ефикаснију имобилизацију која ће резултирати дуготрајном експлоатацијом имобилисаног ензима.

Предвиђа се да ће у докторској дисертацији бити обрађена следећа поглавља: *Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак, Литература.*

У поглављу *Увод* биће дефинисани основни циљеви и предмет истраживања, као и допринос дисертације.

Теоријски део докторске дисертације обухватиће преглед и анализу доступне литературе која се односи на:

- Класификацију метода имобилизације,
- Преглед најчешће коришћених материјала за имобилизацију,
- Преглед метода хемијске модификације површине носача,
- Својства липаза и галактозидаза која су од значаја за имобилизацију
- Примену имобилисаних липаза и галактозидаза
- Реакторске системе у којима се могу експлоатисати имобилисани ензими.

У *Експерименталном делу* биће наведени материјали и методе примењени у експерименталном раду:

- Материјали и хемикалије употребљени у раду,
- Детаљан опис метода и експерименталних техника употребљених у раду.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће представљени и дискутовани резултати експеримената:

- Избор носача одговарајућих карактеристика за имобилизацију,
- Избор погодних метода за хемијску модификацију носача за имобилизацију,
- Оптимизација параметара модификације носача и статистичка обрада података
- Утврђивање погодних постимобилизационих техника стабилизације имобилисаних ензима,
- Испитивање стабилности имобилисаних ензима на повишеној температури,
- Испитивање оперативне стабилности, тј, могућности употребе у више узастопних циклуса,
- Употреба наноматеријала за имобилизацију липаза и галактозидаза,
- Испитивање могућности примене имобилизата у различитим реакторским системима.

У *Закључку* ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз стављање акцента на њихове основне доприносе.

Литература ће садржати наводе цитиране у дисертацији и публикације проистекле из истраживачког рада у оквиру ове дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације под насловом „Хемијска модификација површине носача са циљем добијања имобилисаних липаза и галактозидаза повећане активности и стабилности” коју је предложио Младен Михаиловић, дипл. инж., научно заснована и да представља значајан допринос научној области Технолошко инжењерство, ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидату Младену Михаиловићу одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. За ментора докторске дисертације Комисија предлаже др Дејана Безбрадицу, ванредног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 18.02.2015.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

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

.....
др Александар Маринковић, доцент
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
др Ненад Милосавић, Научни сарадник
Универзитета у Београду,
Хемијски факултет