

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Милице Царевић, дипл. инж. технологије, за израду докторске дисертације

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду од 18.12.2014. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Милице Царевић, дипл. инж. технологије, за израду докторске дисертације и научне заснованости теме „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама”.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Милица Царевић рођена је у Горњем Милановцу где је завршила Основну Школу "Момчило Настасијевић" и Гимназију "Таковски устанак". Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2005/2006. године. Дипломирала је на ТМФ-у на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију 30.06.2009. са оценом 10 на дипломском раду и просечном оценом у току студија 9,43. У периоду од 14. августа до 17. новембра 2009. године похађала је IAESTE праксу на Институту за индустријско млекарство (Санта Фе, Аргентина). По завршетку редовних студија уписала је докторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Дејан Безбрадица, ванредни професор). Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,91, укључујући и завршни испит.

Од 1.02.2011. године Милица Царевић је као истраживач приправник запослена 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, који финансира Министарство науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије. У звање истраживач сарадник изабрана је у фебруару 2013. године.

У фебруару 2012. године завршила је обуку и положила испит за саветника за хемикалије.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Милица Царевић је школске 2009/10 године уписала докторске студије на Технолошко – металуршком факултету Универзитета у Београду на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија. У октобру 2011. године одбранила је завршни рад под називом „Производња микробних β -галактозидаза“ са оценом 10 пред комисијом у саставу: др Дејан Безбрадица, ван. проф., др Зорица Кнежевић-Југовић, ред. проф. и др Маја Вукашиновић-Секулић, ван. проф. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,91 укључујући и завршни испит:

Предмет	ESPB	Оцена
1. Одабрана поглавља математичке анализе	5	9
2. Хемијска кинетика	5	10
3. Одабрана поглавља биохемије – витамини	5	10
4. Биохемијска кинетика	5	10
5. Индустриска микробиологија	5	10
6. Хемија физиолошки активних једињења	5	10
7. Структурна анализа органских молекула	6	10
8. Имобилизациони 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		10
12. Завршни испит	30	10

Ангажована 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, који финансира Министарство науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије.

Од 2013. Године Милица Царевић је ангажована у настави на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија на лабораторијским вежбама из предмета Биотехнолошки практикум 1.

Коаутор је седам радова у међународним часописима (пет М21 и два М23) и једанаест саопштења на домаћим и међународним скуповима (шест М34, четири М63 и један М64).

Објављени научни радови и саопштења

Научни радови у врхунским међународним часописима (M₂₁)

1. 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(2012)=2,579; IF(2013)= 2,368)
2. 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(2013)=2,524)
3. 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 (2013)=2,235)

4. 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. (ISSN: 0268-2575; IF(2013)=2,494)
5. **Carević M.**, Veličković D., Stojanović M., Milosavić N., Rogniaux H., Ropartz D., Bezbradica D.: *Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae**, - Process Biochemistry, in press DOI: 10.1016/j.procbio.2015.01.028. (ISSN:1359-5113; IF(2013)=2,524)

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, No 2, 2013, pp. 239-247. (ISSN 2217-7426; IF(2013)=0,562)
7. **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, in press DOI: 10.2298/HEMIND140303044C. (ISSN 2217-7426; IF(2013)=0,562)

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M₃₄)

8. **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.
9. 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)
10. Prlainović N., Stojanović M., **Carević M.**, Mihailović M., Banjanac K., Marinković A., Bezbradica D.: *Two-step modification of silica nanoparticles for covalent lipase immobilization*, Book of abstracts 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)
11. Mihailović M., **Carević M.**, Stojanović M., Prlainović N., Banjanac K., Bezbradica D.: *Chemical modification of Purolite A109 for application in lipase immobilization*, Book of abstracts 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)
12. **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*, Book of abstracts 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)
13. Jakovetić S., Luković N., Grbavčić S., Jovanović J., Stefanović A., **Carević M.**, Knežević-Jugović Z.: *The kinetic study of oleyl cinnamate synthesis*, Book of abstracts of the 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013, pp 246. (ISBN 978-86-7132-053-5)

Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M₆₃)

14. **Carević M.**, Kasalagidis-Krušić M., Zrilić M., Knežević-Jugović Z., Bezbradica D.: *Dobijanje biodegradabilnih polimera iz krompirovog skroba*, Zbornik radova sa konferencije Biotehnologija za održivi razvoj, Beograd 2010, pp. 81-85. (ISBN: 978-86-7401-269-7)
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, pp. 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, pp. 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*, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd 2012, pp. 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*, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd 2012, pp. 74. (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, ИИИ 46010 (2011-2014), Милица Царевић, дипл. инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Такође, тема докторске дисертације припада области из које је кандидаткиња коаутор (као први аутор) 2 научна рада штампана у међународним часописима и 3 саопштења на међународним и националним скуповима, што указује на то да већ поседује квалитетне научне резултате и показује високу компетентност за рад на предложеној теми докторске дисертације. Поред тога, кандидаткиња поседује одлично знање енглеског језика, у току студентске праксе у иностранству савладала је експерименталне технике и инструменталне методе из области аналитике млечних производа који су предмет истраживања њене дисертације и има искуства у коришћењу различитих софтверских пакета за статистичку обраду резултата, који ће бити неопходни за обраду експерименталних резултата.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет и циљ истраживања ове докторске дисертације је оптимизација ферментационих поступака добијања ензима β -галактозидазе и метода имобилизације овог ензима са циљем даље употребе у трансгалактозилационим реакцијама синтезе једињења са потенцијалном физиолошком активношћу – галактоолигосахарида и галактозида физиолошки активних агликона. Експериментални рад у оквиру докторске дисертације биће подељен у неколико целина: избор најефикаснијег микробног продуцента ензима β -галактозидазе, оптимизација експерименталних фактора за производњу ензима, избор адекватних метода за изоловање и пречишћавање ензима, избор одговарајућих носача и метода за имобилизацију ензима,

синтеза галактоолигосахарида и галактозида физиолошки активних агликона помоћу комерцијалних и добијених β -галактозидаза и избор реакторске конфигурације.

Ензим β -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23, β -D-галактозид-галактохидролаза), позната и под тривијалним називом лактаза, представља ензим који катализује хидролизу терминалних, наредујућих β -D-галактозидних остатака у различитим једињењима. Иако овај ензим није строго специфичан, његова примарна биолошка функција јесте хидролиза лактозе до глукозе и галактозе, што је чини изузетно важним ензимом у прехранбеној индустрији, који поред тога омогућава значајне позитивне ефекте на здравље људи и околину.

Међутим, под одређеним реакционим условима (висока концентрација шећера, ниска активност воде, висока температура), она може катализовати и повратну реакцију синтезе галактозида. На овај начин настаје широк спектар функционално активних једињења међу којима су најпознатији галактоолигосахариди (ГОС). ГОС обухватају разнородну групу несварљивих угљених хидрата изграђених од једне глукозне и неколико галактозних јединица, који су препознати као пребиотици захваљујући томе што подстичу пролиферацију и активност пробиотских бактерија микробиоте црева, а са друге стране врше инхибицију раста лоших бактерија онемогућавајући њихову адхезију на зидове црева. У складу са тим, они имају кључну улогу у омогућавању нормалног функционисања људског организма, пре свега у олакшавању варења лактозе, побољшању ресорпције минералних материја, снижавању нивоа холестерола, смањењу ризика од рака дебелог црева, као и у унапређењу имуног система домаћина. Последњих година, све више пажње посвећује се и развоју синтезе галактозида кратког ланца код којих су акцептори галактозе алкохоли или нека ароматична једињења са слободним хидроксилним групама, за које се верује да представљају инхибиторе галектина, чија је пролиферација у корелацији са настанком бројних болести као што су различити тумори, болести срца и хематолошки проблеми. Ипак, ова поља употребе су још увек у почетној фази истраживања.

Ензим β -галактозидаза може бити различитог порекла - биљног, животињског или микробног. Међутим, најзначајнији међу њима су микробни поступци производње, због лаке ферментације, велике брзине раста и размножавања ћелија, високих приноса, високе активности, као и стабилности ензима. У овој докторској дисертацији ће се испитати могућности производње β -галактозидазе помоћу различитих комерцијалних микробних сојева (бактерија, квасаца и плесни) из колекције култура ATCC (САД) и ARS (САД). Након што буде извршен одабир одговарајућих производних микроорганизама, приступиће се оптимизацији састава хранљивих подлога и услова гајења у циљу побољшања производње ензима. Статистичка обрада добијених резултата пружиће увид у утицај сваког од испитиваних параметара на биосинтезу ензима, као и њихову међусобну интеракцију. Имајући у виду да су β -галактозидазе интрацелуларни ензими биће примењене различите хемијске и механичке методе изоловања ензима и упоређене са аспекта приноса активности ензима и специфичне активности ензима. Добијени ензими биће пречишћени применом стандардних метода фракционог таложења амонијум-сулфатом и различитим хроматографским методама (јоноизмењивачка и гел-филтрациона хроматографија), али биће испитана и могућност имобилизације и пречишћавања у истом кораку. Процес пречишћавања као и чистоћа финалног препарата биће праћени електрофоретским методама. У циљу детаљног карактерисања добијеног ензимског препарата биће испитана температурна и рН активност/стабилност ензима, као и њихови кинетички параметри.

У наредној фази истраживања, биће оптимизовани реакциони параметри (температура, рН, концентрација супстрата и ензима) за синтезу ГОС, односно галактозида салицина помоћу комерцијалних препарата β -галактозидазе и ензима произведених у лабораторији Катедре за биохемијско инжењерство и биотехнологију. Производи реакције биће раздвојени и квантификовани течно хроматографијом високих перформанси и идентификовани масеном спектроскопијом и спектрометријом јонске покретљивости (IMS). Потом, биће испитана могућност имобилизације изолованих β -галактозидаза, као и комерцијалних β -галактозидаза на различите носаче применом различитих техника. Биће примењене методе адсорпције на

комерцијалне јоноизмењивачке смоле, потом ковалентног везивања на носаче (комерцијални и носачи добијени увођењем функционалних група модификацијом са епихлорхидрином и цијанурилхлоридом) и на наночестице силике модификоване увођењем различитих функционалних група, а активности добијених имобилизата биће испитане у реакцији синтезе ГОС, као и у реакцијама хидролизе лактозе из млека и сурутке. С обзиром на то да је у проточним реакторским системима могуће постићи већу продуктивност по маси употребљеног ензима, у последњем делу истраживања биће оптимизован реакторски систем са имобилисаним ензимом (реакција ће бити извођена у проточним реакторима са пакованим, флуидизованим слојем као и реакторима са осцилирајућим током флуида), као и оперативни услови за извођење претходно наведених реакција. Као биокатализатор, биће коришћени добијени имобилисани ензимски препарати који покажу највећу активност у шаржном реактору. Продуктивност имобилисаног система биће испитана при различитим режимима рада биореактора и упоређена са перформансама шаржног поступка. Последњих година објављени су резултати бројних истраживања која се са различитих аспеката баве проблематиком производње и примене микробних β -галактозидаза. У даљем тексту наведени су само неки од њих, који су представљали основу за истраживања и експерименте изведене у оквиру израде ове докторске дисертације:

1. Gosling A., Stevens G.W., Barber A.R., Kentish S.E., Gras S.L.: *Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose*, - Food Chemistry, Vol 121, No 2, 2010, pp. 307–318.
2. Panesar P.S., Panesar R., Singh R.S., Kennedy J.F., Kumar H.: *Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase*, - Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol 81, No 4, 2006, pp. 530–543.
3. Irazoqui G., Giacomini C., Batista-Viera F., Brena B.M., Cardelle-Cobas A., Corzo N., Jimeno M.L.: *Characterization of galactosyl derivatives obtained by transgalactosylation of lactose and different polyols using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae**, - Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol 57, No 23, 2009, pp. 11302-11307.
4. Porciúncula González C., Castilla A., Garófalo L., Soule S., Irazoqui G., Giacomini C.: *Enzymatic synthesis of 2-aminoethyl- β -D-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase*, Carbohydrate Research, Vol 368, 2013, pp. 104-110.
5. Gänzle M.G.: *Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose*. - International Dairy Journal, Vol 22, No 2, 2012, pp. 116–122.
6. Montanari G., Zambonelli C., Grazia L., Benevelli M., Chiavari C.: *Release of β -galactosidase from *Lactobacilli**, - Food Technology and Biotechnology, Vol 38, No 2, 2000, pp. 129–133.
7. Lamsal B.P.: *Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides*, - Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol 92, No 10, 2012, pp. 2020–2028.
8. Torres D.P.M., Gonçalves M.P.F., Teixeira J.A., Rodrigues L.R.: *Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics*, - Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol 9, No 5, 2010, pp. 438-454.

9. Vera C., Guerrero C., Illanes A.: *Determination of the transgalactosylation activity of Aspergillus oryzae β -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations*, - Carbohydrate Research, Vol 346, No 6, 2011, pp. 745–752.
10. Mahoney R.R.: *Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review*, - Food Chemistry, Vol 63, No 2, 1998, pp. 147-154.
11. Urrutia P., Rodriguez-Colinas B., Fernandez-Arrojo L., Ballesteros A.O., Wilson L., Illanes A., Plou F.J.: *Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from Aspergillus oryzae*, - Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol 61, No 5, 2013, pp. 1081–1087.
12. Wang H., Yang R., Hua X., Zhao W., Zhang W.: *Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives*, - Applied Microbiology and Biotechnology, Vol 97, No 14, 2013, pp. 6167–6180.
13. Vasiljevic T., Jelen P.: *Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria*, - Innovative Food Science and Emerging Technologies, Vol 2, No 2, 2001, pp. 75–85.
14. Fiedurek J., Szczodrak J.: *Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis*, - Acta Microbiologica Polonica, Vol 43, No, 1994, pp. 57–65.

3. Полазне хипотезе

Повећана свест о вишеструким благотворним ефектима функционалне хране, а пре свега пребиотика, на људско здравље, узроковала је велики број истраживања у области проналажења нових пребиотских једињења, као и оптимизовања њихове производње. Под пребиотицима се подразумевају несварљиви састојци хране који омогућавају специфичне промене у саставу и/или активности гастроинтестиналне микробиоте што повољно утиче на свеобухватно здравље човека. Нарочиту пажњу последњих година привлаче пребиотска једињења галактоолигосахарида, разнородна група несварљивих угљених хидрата изграђених од једне глукозне и неколико галактозних јединица, који се могу знатно разликовати у степену полимеризације, врстама веза, а сходно томе и особинама. Они се могу наћи као природни састојци хуманог млека, али се тренутно интензивно ради на развијању ензимских поступака добијања галактоолигосахарида из лактозе помоћу ензима β -галактозидазе. Прегледом актуелне научне литературе установљено је да се под одређеним условима (висока концентрација лактозе, високе температуре и ниска активност воде) може синтетисати смеша различитих галактоолигосахарида у још увек скромним приносима. Утицај кључних експерименталних фактора (концентрације и врсте ензима, концентрације воде, температуре, рН вредности и почетне концентрације лактозе) на принос производа и међусобне интеракције ових фактора, међутим, нису детаљно испитани. Такође, недовољно је испитана и кинетика ензимске синтезе ових једињења, као и међусобни односи паралелних реакција хидролизе и трансгалактозилације, односно није предложена адекватна интегрална кинетичка модел који би описао цео ток реакције и олакшао пројектовање биореактора. Већина досадашњих истраживања била је фокусирана на синтезу галактоолигосахарида помоћу постојећих комерцијалних ензимских препарата, па је од изразитог значаја проналажење нових, специфичних микробних β -галактозидаза које ће показати високу активност, стабилност и омогућити добијање тачно дефинисаних галактоолигосахарида. У циљу унапређења продукције микробних β -галактозидаза жељених особина, потребно је

извршити правилан избор продуцената, потом оптимизовати услове гајења (температура, рН, аерација, мешање) и оптимизовати састав подлоге. Такође, у циљу постизања доброг приноса ензима, а по што приступачнијој цени, потребно је изабрати одговарајуће методе изоловања и пречишћавања ензима. Како су до сада описани углавном шаржни реакторски системи, неопходно је добити имобилисани препарат, супериорних карактеристика, који ће омогућити снижавање укупних процесних трошкова у односу на процесе са комерцијалним ензимима, али и омогућити континуално извођење реакције у проточним реакторима.

Поред тога, велики научно-истраживачки потенцијал постоји у области синтезе галактозида различитих физиолошки активних агликаона. Иако је недавно потврђено да представљају инхибиторе галектина, чија је пролиферација у корелацији са настанком бројних болести као што су различити тумори, болести срца и хематолошки проблеми, свега неколико публикација са овом тематиком је објављено и углавном се свode на информацију о могућности синтезе ових производа катализоване ензимима. Стога, остало је неистражено подручје оптимизације реакционих фактора ради повећања приноса физиолошки активних галактозида, нарочито кинетике овог процеса, јер су ове реакције углавном кинетички контролисане због истовременог одигравања синтетских реакција и хидролизе производа синтезе.

Узевши у обзир све претходно наведено, хипотезе које се могу издвојити као полазна основа за започињање научно-истраживачког рада у оквиру ове дисертације су следеће:

- Тестирање великог броја микробних продуцената омогућиће проналажење ензима тачно дефинисаних карактеристика за примену у реакцијама трансгалактозилације,
- Поступак производње ензима може се вишеструко поспешити оптимизацијом састава хранљиве подлоге и параметара процеса,
- Правилан избор метода разарања ћелија и изоловања и пречишћавања ћелијског екстракта побољшаће принос активности интрацелуларног ензима,
- Оптимизацијом кључних реакционих услова омогућиће се постизање бољих приноса производа трансгалактозилације, као и састава производа, а тиме и физиолошке активности,
- Применом различитих имобилизационих техника омогућиће се повећана економска исплативост и ефикасност процеса, а постоји и могућност модификовања афинитета β -галактозидаза према различитим супстратима која може довести до измењене селективности и различитог састава финалних производа,
- С циљем повећања продуктивности процеса, испитаће се могућност рада у проточним реакторима, и то реактору са пакованим и флуидизованим слојем, као и у реактору са осцилирајућим током флуида.

4. Научне методе истраживања

Избор микробних продуцента ензима β -галактозидаза биће извршен техником субмерзног гајења у основним и модификованим синтетичким хранљивим подлогама како би се жељени ензим добио у одговарајућем приносу. Имајући у виду интрацелуларну природу овог ензима за изоловање ензима биће примењене различите механичке (ултразвучно разарање, млевање у присуству различитих абразивних средстава, наизменично замрзавање и одмрзавање) и хемијске (третирање ћелија детергентима и растварачима) методе разарања ћелија. У циљу поређења добијених препарата, биће праћене хидролиза *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозидом (*o*-NPG) и концентрација протеина спектрофотометријским методама. Утицаји најважнијих процесних параметара испитаће се применом методе планираних

експеримената како би се поступак производње оптимизовао са становишта приноса активности и специфичне активности ензима. Изоловани ензимски препарат биће пречишћен методом фракционог таложења амонијум-сулфатом, као и различитим хроматографским методама (гел-филтрациона хроматографија, јоноизмењивачка хроматографија) и окарактерисан електрофоретским техникама.

Производи реакције синтезе галактозида салицина и галактоолигосахарида биће раздвојени и квантификовани течноом хроматографијом високих перформанси. Концентрација галактозида салицина биће квантификована применом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC) помоћу аналитичке C₁₈ колоне, а као мобилна фаза биће коришћена смеша метанол/вода. Производ ће у овом случају бити детектован помоћу UV детектора. За анализу галактоолигосахарида користиће се аналитичка колоне за шећере (Hyper REZ HP Carbohydrate Ca²⁺), а као мобилна фаза биће коришћена вода. Детекција производа биће извршена помоћу рефрактометријског детектора (RID). У оба случаја доказивање структуре и идентификација добијених производа биће извршене спектрометријом јонске покретљивости (IMS).

За планирање експеримента, статистичку анализу и интерпретацију добијених резултата ће бити коришћен софтверски пакет Stat Ease Design Expert, док ће за одређивање интегралног кинетичког модела бити примењен MATLAB.

Имобилизација β -галактозидаза на различите носаче биће извршена применом различитих техника, а приликом карактеризације имобилисаних ензимских препарата, биће коришћена FTIR спектроскопска анализа и електронска микроскопија. Најбољи имобилисани препарати биће примењени у различитим реакторским системима (шаржни, проточни реактор са пакованим и флуидизованим слојем, као и реактор са осцилирајућим током флуида).

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос на пољу производње, имобилизације и примене β -галактозидаза као биокатализатора у трансгалактозилационим реакцијама добијања функционално активних једињења- галактозида салицина и галактоолигосахарида. У оквиру истраживања може се очекивати неколико основних доприноса, и то:

- Избор погодног микробног продуцента ензима,
- Оптимизација процеса производње, изоловања и пречишћавања β -галактозидаза,
- Детаљна карактеризација добијеног ензимског препарата,
- Синтеза физиолошки активних једињења (галактозида салицина и галактоолигосахарида)
- Оптимизација најбитнијих процесних параметара и одређивање кинетичког модела у трансгалактозилационим реакцијама,
- Развој ефикасних имобилисаних система,
- Избор одговарајућег реакторског система и оптималног режима рада за примењени систем у реакцијама синтезе галактоолигосахарида.

6. План истраживања и структура рада

Предмет истраживања ове дисертације је развој ферментационог поступка добијања и изоловања микробних β -галактозидаза са циљем даље употребе у синтези функционалних

једињења (галактоолигосахарида и галактозида салицина). Током израде дисертације биће испитани потенцијални микробни продуценти ензима, утицај састава подлоге и услова гајења на принос активности ензима, избор адекватних метода изоловања и пречишћавања, као и имобилизације ензима, њихово поређење са доступним комерцијалним препаратима ензима у трансгалактозилационим реакцијама, као и развој реакторски системи за ефикасну синтезу галактоолигосахарида.

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:

- Својства и примене микробних β -галактозидаза
- Значај галактоолигосахарида и других галактозида
- Ензимско добијање галактоолигосахарида и других галактозида
- Ензимску кинетику трансгалактозилационих реакција
- Примену и физиолошку активност галактоолигосахарида и других галактозида

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

- Хемикалије и микроорганизми употребљени у раду
- Инструменти употребљени у раду
- Опис експерименталних техника

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

- Избор најефикаснијег микробног продуцента β -галактозидаза
- Оптимизација параметара ферментације за добијање ензима
- Избор метода изоловања ензима
- Пречишћавање и карактеризација ензима
- Оптимизација процесних параметара синтезе галактоолигосахарида
- Оптимизација процесних параметара синтезе галактозида салицина
- Имобилизација β -галактозидаза
- Оперативна стабилност и термичка стабилност имобилисаних препарата
- Примена имобилисаних препарата у развијеним трансгалактозилационим реакцијама
- Оптимизација режима рада и конфигурације реакторског система

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 „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама” коју је предложила Милица Царевић, дипл. инж., научно заснована и да представља значајан допринос научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област 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 Миlici Царевић одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. За ментора докторске дисертације Комисија предлаже др Дејана Безбрадицу, ванредног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Др Дејан Безбрадица, ван. проф.
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Зорица Кнежевић-Југовић, ред.
проф. Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Маја Вукашиновић-Секулић,
ван. проф. Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Душан Величковић,
Научни сарадник Универзитета у
Београду, Хемијски факултет