

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата **Наташа Шекуљице** за израду докторске дисертације

Одлуком бр. 35/197 од 11.05.2015. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата **Наташа Шекуљице** за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода**.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Наташа Ж. Шекуљица рођена је 02.10.1987. године у Задру. Основну школу завршила је у Старој Пазови, док је средњу школу завршила у Земуну. Одмах по завршетку средње школе уписала је студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду и дипломирала у року са просечном оценом 8,42. Завршни рад на тему "Производња протеазе из *Pseudomonas san-a*i и њена примена у детергентима" под руководством ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић одбранила је оценом 10. Мастер рад на тему "Карактеризација липаза из *Rhizopus oryzae* гајеним субмерзним поступком ферментације" под руководством истог ментора одбранила је оценом 10. На Хемијском факултету Универзитета у Београду у мају 2013. године положила је испит и стекла лиценцу Саветник за хемикалије.

Докторске студије уписала је 2011/2012. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на одсеку Биохемијско инжењерство и биотехнологија под руководством ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,45, као и завршни рад са темом "Уклањање синтетичких боја из отпадних вода пероксидазом из рена" са оценом 10.

Од марта 2012. године до 01.10.2014. године ангажована је као стипендиста на пројекту Министарства просвете и науке 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". Од октобра 2014. запошљава се у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач на пројекту "Електрохемијска синтеза и

карактеризација наноструктурираних функционалних материјала за примену у новим технологијама" (бр. ОН 172046).

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Наташа Ж. Шекуљица је школске 2011/2012. године уписала докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија.

Положени испити на докторским студијама:

Предмет	Оцена	ЕСПБ
Имобилисани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	10	6
Индустријска микробиологија	10	5
Површински активне материје	10	4
Хемијска кинетика	9	5
Енглески језик	10	-
Одабрана поглавља инструменталне анализе	6	7
Санитарна микробиологија	10	4
Одабрана поглавља биохемије-витамини	10	5
Одабрана поглавља математичке анализе	9	5
Биохемијска кинетика	10	5
Биоактивне материје у козметичким производима	10	4
Завршни испит	10	30
Просечна оцена 9,45		Збир ЕСПБ поена 80

У току докторских студија ангажована је у оквиру пројеката:

- "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности", пројекат Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. ИИИ 46010 од марта 2012. године до 01.10.2014. године.
- "Електрохемијска синтеза и карактеризација наноструктурираних функционалних материјала за примену у новим технологијама" (бр. ОН 172046) од октобра 2014. године.

Из досадашњег научно-истраживачког рада Наташа Ж. Шекуљице, проистекли су следећи резултати:

(M21) Рад у врхунском међународном часопису

1. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Andrea B. Stefanović, Milena G. Žuža, Dragana Z. Čičkarić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, Decolorization of anthraquinonic dyes from textile effluent using horseradish peroxidase: Optimization and kinetic study, *The World Scientific Journal*, vol. 2015, Article ID 371625, 12 pages, 2015, ISSN: 1532 2246, (IF (2013)-1,219; Multidisciplinary Sciences 16/55).

(M22) Рад у истакнутом међународном часопису

1. Andrea B. Stefanović, Jelena R. Jovanović, Sanja Ž. Grbavčić, **Nataša Ž. Šekuljica**, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović, Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production, *European Food Research and Technology*, 239(6) (2014) 979–993, ISSN: 1438-2377, (IF (2014)-1,559; Food Science & Technology 53/122).

(M23) Рад у међународном часопису

1. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, Andrea B. Stefanović, Sanja Ž. Grbavčić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, Immobilization of horseradish peroxidase by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye, *Hem. Ind.*, (2015) (IF (2014) =0,364; Engineering, Chemical 121/134), DOI:10.2298/HEMIND150220028S.

(M33) Саопштење са међународног скупа штампано у целини

1. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, Andrea B. Stefanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, Kaolin as a support for the immobilization of horseradish peroxidase: Application in anthraquinonic dyes decolorization from wastewater, IV INTERNATIONAL CONGRESS, ENGINEERING, ECOLOGY AND MATERIALS IN THE PROCESSING INDUSTRY, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04.03.-06.03. 2015, Proceedings, p. 287–292, ISBN 978-99955-81-18-3.
2. Zorica D. Knežević-Jugović, Jelena R. Jovanović, Andrea B. Stefanović, Milena G. Žuža, **Nataša Ž. Šekuljica**, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, "Antioxidant activity of peptide fractions obtained by membrane ultrafiltration of egg white protein enzymatic hydrolysates", IV INTERNATIONAL CONGRESS, ENGINEERING, ECOLOGY AND MATERIALS IN THE PROCESSING INDUSTRY, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04.03.-06.03. 2015, Proceedings, p. 278–286, ISBN 978-99955-81-18-3.
3. Jovanović, J., Stefanović, A., Grbavčić, S., **Šekuljica, N.**, Elmalimadi, M., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z.: Peptides with improved antimicrobial activity screened by membrane ultrafiltration from egg white protein hydrolysates, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranske Matliare, Slovakia, May 25-29, 732–739, 2015, ISBN: 978-80-89475-14-8.*

(M34) Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. Nevena Luković, Sonja Jakovetić, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, Andrea Stefanović, **Nataša Šekuljica**, Zorica Knežević-Jugović, "Production of antioxidative egg-white hydrolysates in a circle batch membrane reactor", 7th Central European Congress Food-CEFood, Food Chain Intergadion, Ohrid, Macedonia, 21-24 May 2014, Book of Abstract, page 220, ISBN 987-608-4565-05-5.
2. Jelena Jovanović, Andrea Stefanović, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, **Nataša Šekuljica**, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović, "Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis", *Food Quality & Safety, Health & Nutrition 1st Conference*, 27-29 November 2014, Skopje, Macedonia, Book of Abstract, page 76, ISBN 978-608-4565-06-2.

(M63) Саопштење са националног скупа штампано у целини

1. Jelena Jovanović, Andrea Stefanović, Milena Žuža, **Nataša Šekuljica**, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Zorica Knežević-Jugović, "Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije", u: Vladimir Dasković i Dušan Marković (ur.): *XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak 07-08. Mart 2014. Zbornik radova, Vol. 19 (21), str. 281-285, ISBN 987-86-87611-31-3.

(M64) Саопштење са националног скупа штампано у изводу

1. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, "Dekolorizacija antrahinonskih boja peroksidazom iz rena imobilisanom na kaolin", 51. Savetovanje Srpskog Hemijskog društva, Niš 5-7. Juni 2014, Kratki izvodi radova, str. 69, ISBN 978-86-7132-054-2.
2. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Andrea B. Stefanović, Jelena R. Jovanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, Obezbojavanje antrahinonskih boja peroksidazom izolovanom iz svežeg ekstrakta rena, 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 29.i 30.maj 2015. Kratki izvodi radova, str. 100, ISBN 978-86-7132-056-6.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата досадашњих истраживања у области Биохемијског инжењерства и биотехнологије, а нарочито у области примене биокатализатора у третману отпадних вода загађених синтетичким бојама, као и броја и квалитета објављених радова, комисија оцењује да је Наташа Ж. Шекуљица, маг. инжењер технологије, показала склоност, самосталност и изразиту способност за обављање научно-истраживачког рада, те да је подобна за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

2.1. Предмет научног истраживања

Предмет научног истраживања у оквиру предложене теме је развој одрживог, еколошки и економски прихватљивог решења уклањања синтетичких боја из отпадних вода различитих грана индустрије применом ензима као биокатализатора. Као модел ензим захваљујући својој специфичности, лакој доступности и развијеним поступцима изоловања, пречишћавања и производње изабрана је пероксидаза из корена рена (ЕС 1.11.1.7). Изабрани биокатализатор ће се испитати са аспекта примене у уклањању синтетичких боја у нативном облику и у облику имобилисаног биокатализатора у одговарајућој конфигурацији биореактора.

Загађење воде представља један од најкомплекснијих глобалних еколошких проблема. Највеће количине отпадних вода генеришу се у производним погонима већине индустријских грана, које не поседују адекватан систем за пречишћавање отпадних вода и занемарују проблематику испуштања истих у водотокове и загађење животне средине. Индустријске отпадне воде су богате киселинама, базама, пестицидима, солима, детергентима, бактеријама, вирусима, бојама. Синтетичке боје представљају неизоставну компоненту у свим гранама индустрије козметичкој, прехранбеној, фармацеутској, текстилној и другим. Класификују се као токсична, канцерогена и мутагена једињења или у природним условима могу дати производе разградње од којих су многи токсични и/или имају мутагено и канцерогено дејство. Поред тога, синтетичке боје које се налазе у отпадној води су изузетно видљиве чак при ниским концентрацијама што нарушава процесе фотосинтезе, а самим тим и развој и репродукцију водених организама.

Проблематика уклањања синтетичких боја из отпадних вода, иако интензивно проучавана задњих деценија, није добила ефикасно и еколошки прихватљиво решење. На основу прегледа литературе може се закључити да је посебна пажња посвећена уклањању азо боја које се налазе на првом месту по заступљености у отпадним водама. Следеће по заступљености су антрахинонске боје и оне су изабране као модел боје у овој дисертацији због изузетно тешког уклањања из отпадних вода, што је последица стабилности коју им дају кондензовани ароматични прстенови у структури. У литератури су испитане могућности коришћења различитих метода за уклањање антрахинонских боја, које могу бити грубо подељене на неколико категорија: физичке (адсорпција, мембранска филтрација, коагулација/флокулација, преципитација), хемијске (осидо-редукционе реакције озоном и Фентоновим реагенсом), електрохемијске и биолошке. Међутим, отпадне воде које садрже антрахинонске боје је тешко третирати јер су многе од њих отпорне на утицај светлости,

топлоте, оксидационих агенаса и микроорганизама, па су наведене методе често недовољно ефикасне за њихово квантитативно уклањање. Већина метода захтева дуготрајан третман и ефикасне су само при ниским концентрацијама боје, а неке услед високе цене и сложености процеса нису у комерцијалној употреби. Тренутно не постоји јединствен и ефикасан третман отпадних вода који би могао бити примењен на све обојене ефлуенте, првенствено због њихове комплексности.

Све већи истраживачки потенцијали у свету су усмерени на испитивање могућности примене ензима за обезбојавање отпадних вода, било као засебног третмана или у комбинацији са конвенционалним поступцима, због великог броја њихових предности попут велике специфичности, способности деловања на боју у широком опсегу концентрација, рН вредности и у присуству других контаминаната, лаког руковању, веће могућности стандардизације поступка. Ензими могу да делују на циљане полутанте на специфичан начин и уклањају их таложењем или превођењем у нетоксичне производе. У ове сврхе највише су испитане пероксидазе и остале оксидо-редуктазе и то манган пероксидаза и лигнин пероксидаза из гљивица белог труљења попут *Phanerochaete chrysosporium*, цитохром С оксидаза изолована из квасца, хлоропероксидаза из *Calderomyces fumago*, лактопероксидаза из млека, фенолна оксидаза, пероксидаза из рена и друге. У овој дисертацији испитаће се могућност уклањања антрахинонских боја оксидо-редукционим реакцијама катализованим слободном и имобилисаном пероксидазом из рена.

У првом делу рада извршиће се оптимизација параметара реакције катализоване слободном пероксидазом са аспекта ефикасности уклањања изабраних антрахинонских боја. Као потенцијално најважнији параметри реакције разматраће се утицаји рН, концентрације ензима (односа ензим/супстрат), концентрације боје, времена контакта и концентрације водоник-пероксида. Након оптимизације процесних параметара испитаће се почетна кинетика реакције при различитим почетним концентрацијама антрахинонске боје и водоник-пероксида. На добијене експерименталне резултате примениће се различити кинетички модели двосупстратних реакција који се одвијају по секвенцијалном или пинг-понг механизму и који третирају проблем инхибиције супстратом у вишку. На тај начин утврдиће се вредности кинетичких параметара и то привидне Михаелисове константе за оба супстрата, максималне брзине реакције, и константе специфичности (k_{cat}/K_m). Исто тако, испитаће се утицаји инхибиције оба супстрата у вишку и одредиће се врсте инхибиције и јачине инхибиције у систему са нативним (слободним) ензимом.

Основни проблем за развој ензимских процеса на комерцијалном нивоу је мала оперативна стабилност нативних пероксидаза у присуству сопствених супстрата и на повишеним температурама. Да би се превазишли ови проблеми у технолошком смислу посебан значај има примена имобилисаних пероксидаза на различитим чврстим носачима чиме се омогућава њихова стабилизација, виšekратна примена, олакшана сепарација и континуално извођење процеса у биореакторима различитих конфигурација. Стога, следећи корак научног истраживања биће развој имобилисаног система са пероксидазом из рена у биореактору одговарајуће конфигурације и њена конкретна примена у обезбојавању антрахинонских боја.

Избор носача у великој мери утиче на перформансе имобилисаног биокатализатора. Као носач за имобилизацију пероксидазе из рена примениће се неоргански носач, каолин, због ниске цене и комерцијалне доступности. Методе имобилизације које ће се испитати су: адсорпција, имобилизација применом глутаралдехида и ковалентна имобилизација. Поред наведених метода, испитаће се и могућност имобилизације пероксидазе из рена без примене носача у облику умрежених ензимских агрегата (CLEA, на енглеском cross-linked enzyme aggregates). За овакве биокатализаторе се очекује да ће показати велику термалну и рН стабилност, што ће се, наравно, утврдити на основу проучавања кинетике термалне дезактивације ензима на неколико температура као и стабилности у растворима при различитим рН вредностима. У случају свих примењених метода имобилизације, добијени биокатализатори ће бити окарактерисани конкретно у реакцији обезбојавања неколико

антрахинонских модел боја (C.I. Acid Violet 109 и C.I. Acid Blue 225) и упоређени са референтним системом са слободним ензимом. Делимична карактеризација биокатализатора подразумева одређивање масе везаног ензима на носачу, специфичне активности, приноса имобилизације, познавање рН и температурног профила, термалне стабилности, стабилности при складиштењу и могућности рециклације при извођењу реакције у шаржном реактору. Поред тога, одредиће се оперативна стабилност ензима у проточном реактору са пакованим слојем честица биокатализатора са рецикулацијом смеше супстрата.

У свим имобилисаним системима испитаће се кинетика двосупстратне реакције и ефекти инхибиције бојом и водоник-пероксидом како би се на основу добијених резултата извели одговарајући кинетички модели за слободан и имобилисани ензим. На основу вредности добијених кинетичких параметара изабраће се најефикаснији имобилисани систем и указаће се на потенцијалне могућности унапређења ензимског процеса тако што ће се смањити инхибиција ензима бојом и/или водоник-пероксидом.

Циљеви истраживања у предложеној докторској дисертацији су:

- Проучавање ензимски катализованог третмана отпадних вода обојених синтетичким бојама;
- Оптимизација процесних параметара уклањања синтетичких боја применом слободне пероксидазе из рена;
- Развој ефикасног имобилисаног система са пероксидазом за обезбојавање отпадних вода адсорпцијом ензима на неоргански носач, каолин;
- Развој ефикасног имобилисаног система са пероксидазом техником формирања умрежених ензимских агрегата без носача;
- Оптимизација уклањања антрахинонских боја имобилисаном пероксидазом из рена у шаржном и реактору са пакованим слојем;
- Утврђивање кинетике бисупстратне реакције катализоване у систему са слободним и имобилисаним ензимом под претходно одређеним оптималним условима реакције као утврђивање ефеката инхибиције у оба система;
- Утврђивање механизма одвијања реакције на основу добијених кинетичких резултата и хемијске структуре насталих производа;
- Проучавање токсичности отпадних вода пре и након ензимског третмана.

Релевантни библиографски извори

- [1] Tehrani-Bagha P., Holmberg K., *Solubilization of Hydrophobic Dyes in Surfactant Solutions*, Materials, Vol. 6, No. 2, 2013, pp. 580–608.
- [2] Julkapli N.M., Bagheri S., Hamid S.B.A., *Recent Advances in Heterogeneous Photocatalytic Decolorization of Synthetic Dyes*, The Scientific World Journal, Vol. 2014, Article ID 692307, 25 pages, 2014.
- [3] Ibrahim M. B., Poonam N., Datel S., Roger M., *Microbial decolorization of textile dye- containing effluents: a review*, Bioresource Technology, Vol. 58, No. 3, 1996, pp. 217–227.
- [4] Nyanhongo G. S., Gomes J., Gunitz G. M., Zvanya R., Read J., Stiner W., *Decolorization of textile dyes by laccases from newly isolated strain of Trametes modesta*, Water Research, Vol. 36, No. 6, 2002, pp.1449–1456.
- [5] Song S., Yao J., He Z., Qiu J., Chen J., *Effect of operational parameters on the decolorization C.I. Reactive blue 19 in aqueous solution by ozone-enhanced electrocoagulation*, Journal of Hazardous Materials, Vol. 151, No. 1, 2008, pp. 204–210.
- [6] Celebi M., Altikatoglu M., Akdestre Z. M., Yildirim H., *Determination of decolorisation properties of Reactive Blue 19 dye using horseradish peroxidase enzyme*, Turkish Journal of Biochemistry, Vol. 37, No. 2, 2012, pp. 200–206.
- [7] Dos Santos A. B., Cervantes F. J., Van Lier J. B., *Review paper on current technologies for decolorization of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology*, Bioresource Technology, Vol. 98, No. 12, 2007, pp. 2369–2385.

- [8] Liu J., Sun G., *The biocidal properties of anthraquinoid dyes*, Dyes Pigments, Vol. 81, No. 3, 2009, pp. 231–234.
- [9] Novotny C., Dias N., Kapanen A., Malachova K., Vandrovicova M., Itavaara M., Lima N., *Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes*, Chemosphere, Vol.63, No. 9, 2006, pp. 1436–1442.
- [10] Robinson T., McMullan G., Nigam P., Marchant R., *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative*, Bioresource Technology, Vol. 77, No. 3, 2001, pp. 247–255.
- [11] McMullan G., Meehan C., Coneely A., Nirby N., Robinson T., Nigam P., Bannat I. M., Marchant R., Smyth W.F., *Microbial decolourisation and degradation of textile dyes*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 56, No. 1, 2001, pp. 81–87.
- [12] Andleeb S., Atiq N., Robson G., Ahmed S., *An investigation of anthraquinone dye biodegradation by immobilized Aspergillus flavus in fluidized bed bioreactor*, Environmental Science and Pollution Research, Vol. 19, No. 5, 2012, pp. 1728–1737.

3. Полазне хипотезе

Рад на овој докторској дисертацији осмишљен је под претпоставком да се ензими, тачније пероксидаза из рена, може успешно имплементирати као биокатализатор у третману отпадних вода као еколошки прихватљиво и економски оправдано решење. Претпоставка је да се помоћу овог ензима у оптимизованом процесу може остварити ефикаснија разградња антрахинонских боја на економичнији начин у односу на конвенционалне физичко-хемијске методе.

Приликом израде ове докторске дисертације полази се од следећих претпоставки:

- Ензимски катализоване реакције су еколошки прихватљивије од конвенционалних физичко/хемијских метода које се примењују у третману отпадних вода;
- Пероксидаза из рена је строго специфичан ензим који оксидује велики број органских једињења, па и антрахинонске боје, трансформишући их у мање токсична и/или нетоксична једињења;
- Пероксидаза из рена је строго специфичан ензим са високим процентом уклањања синтетичких боја под благим реакционим условима (pH, температуре) и у присуству пратећих контаминаната;
- Применом ензима у обезбојавању отпадних вода значајно се смањује токсичност истих, како за животну средину тако и за човека;
- Биокаталитичка својства пероксидазе као што су термичка и pH стабилност, стабилност у присуству контаминаната и оперативна стабилност, могу се вишеструко побољшати имобилизацијом ензима на неоргански носач, каолин, применом различитих метода;
- Биокаталитичка својства пероксидазе могу се, исто тако, вишеструко побољшати имобилизацијом ензима техником формирања умрежених ензимских агрегата без носача. Наведена метода имобилизације је веома значајна јер се може постићи велика концентрација ензима у реактору, а тиме и већи просторно-временски принос реактора;
- Примена имобилисаних пероксидаза допринеће додатној стабилизацији ензима и омогућиће вишекратну употребу ензима у шаржном процесу и/или континуално извођење реакције у реакторима са пакованим слојем што ће додатно допринети укупним технолошким перформансама и економији процеса;
- Реакција са имобилисаном пероксидазом из рена пројектовањем одговарајуће конфигурације биореактора моћи ће да се прошири са примене на лабораторијском нивоу на третман отпадних вода на индустријском нивоу.

4. Научне методе истраживања

Како би се пратила активност пероксидазе из рена у обезбојавању синтетичких боја, прво је потребно развити методу за одређивање активности пероксидазе. Активност пероксидазе из рена одређиваће се спектрофотометријски коришћењем пирогалола као стандардног супстрата и водоник-пероксида као ко-супстрата. Проценат разградње антрахинонских боја пратиће се спектрофотометријски на карактеристичним апсорпционим максимумима испитиваних боја одређених снимањем њиховог UV спектра. Ефикасност имобилизације пратиће се одређивањем масе везаних протеина добијене применом модификоване Лоријеве методе за одређивање садржаја протеина. Носач за имобилизацију пре и након везивања ензима окарактерисаће се са аспекта специфичне површине и порозности (BET), морфологије носача (SEM), док ће образовање потенцијалних веза између носача и ензима утврдити применом Фуријеове инфрацрвене спектроскопије (FT-IR).

Синтетичке боје се класификују као токсична једињења и изузетно је важно испитати токсичног нетретираниог раствора као и раствора добијеног након ензимског третмана. У циљу одређивања токсичности раствора пре/након ензимског третмана одређиваће се хемијска потрошња кисеоника (ХПК) и укупни органски угљеник (УОУ) применом стандардних метода, док ће се применом течне хроматографије утврдити хемијски састав интермедијера и крајњих производа ензимске разградње боје.

5. Очекивани научни допринос

По завршетку предложених истраживања може се очекивати следећи научни допринос:

- Еколошки прихватљиво и економски оправдано решење за третман обојених индустријских отпадних вода применом ензима као биокатализатора;
- Оптимизација процесних параметара у реакцији обезбојавања отпадних вода катализованом слободном пероксидазом и пероксидазом имобилисаном различитим поступцима;
- Избор одговарајуће конфигурације биореактора са потенцијалном применом у индустријским постројењима за третман отпадних вода;
- Смањење токсичности отпадних вода;
- Смањење/изостанак проблема генерисања активног муља;
- Научни допринос разумевању механизма и кинетике ензимске реакције уклањања антрахинонских боја у различитим системима са имобилисаном пероксидазом, нарочито врстама и ефектима инхибиције.

6. План истраживања и структура рада

У оквиру ове докторске дисертације испитаће се могућност примене ензима у третману отпадних вода и заштити животне средине. Основни циљ овог истраживања јесте сакупљање што већег броја експерименталних података на чијем темељу ће се изградити еколошки и економски прихватљиво решење третмана отпадних вода, обојених синтетичким бојама у циљу очувања и заштите животне средине. У складу са представљеним планом, докторска дисертација ће садржати следећа поглавља:

1. Увод
2. Теоријски део
3. Експериментални део
4. Резултати и дискусија
5. Закључак
6. Литература
7. Прилози

У оквиру наведених поглавља биће приказано следеће:

1. У Уводу биће дефинисан предмет рада, актуелност проблематике у свету, значај истраживања и допринос.

2. Поглавље *Теоријски део* обухватиће:
 - Проблематику третмана отпадних вода (методе уклањања синтетичких боја из отпадних вода, предности и недостатке);
 - Карактеризацију пероксидазе из рена (класификација, структура, каталитички механизам);
 - Структура, класификација и својства синтетичких боја;
 - Методе и технике имобилизације ензима са посебним акцентом на адсорпцију, ковалентну имобилизацију и имобилизацију умрежавањем у облику ензимских агрегата;
 - Кинетика ензимски катализованих бисупстратних реакција;
 - Примена имобилизованих система у шаржном и у реактору са пакованим слојем са рецикулацијом смеше.
3. Поглавље *Експериментални део* обухватиће:
 - Материјале коришћене у изради докторске дисертације;
 - Опис опреме која се користи за експериментална истраживања;
 - Опис техника и метода за извођење експеримената;
 - Методе за одређивање активности слободне и имобилизоване пероксидазе;
 - Поступак оптимизације уклањања антрахинонских боја (оптимално време контакта, рН, концентрација ензима, концентрације боје, концентрације водоник-пероксида) нативном и имобилизованом пероксидазом из рена (адсорпцијом, ковалентном имобилизацијом, умрежавањем ензима);
 - Поступак одређивања кинетичких параметара реакције катализоване слободном и имобилизованом пероксидазом;
 - Методе за одређивање садржаја протеина;
 - Методе за карактеризацију материјала коришћеног за имобилизацију пероксидазе (FT-IR, SEM, BET);
 - Методе за одређивање токсичности раствора након ензимског третмана (ХПК, УОУ).
 - Поступак оптимизације уклањања испитиваних боја имобилизованом пероксидазом из рена у одговарајућој конфигурацији биореактора.
4. У оквиру *Резултата и дискусије* биће представљени и дискутовани резултати истраживања.
 Детаљно ће бити продискутовани резултати везани за оптимизацију процесних параметара при извођењу реакције са слободном и имобилизованом пероксидазом. Квантитативно ће се разматрати утицаји процесних параметара на ефикасност уклањања модел антрахинонских боја. Посебно ће бити дискутовани могућности побољшања биокаталитичких својстава пероксидазе из рена имобилизацијом помоћу неколико различитих техника и то у реакцији од практичног значаја, уклањању две антрахинонске боје C.I. Acid Violet 109 и C.I. Acid Blue 225. На основу добијених кинетичких параметара у систему са нативним и имобилизованим ензимом у реакторима различитих конфигурација дискутоваће се утицај носача, методе имобилизације и дифузионих лимитација на брзину реакције и ефекте инхибиције. Исто тако, кинетички подаци даће увиде у механизме одвијања реакције у овим системима.
5. У *Закључку* ће бити сумарно представљени добијени резултати добијени на основу приказаних истраживања и представљена могућност уклањања синтетичких боја из отпадних вода ензимском катализом.
6. *Литература* ће садржати наводе цитиране у дисертацији као и радове који су проистекли истраживањем у оквиру ове докторске дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације под насловом: „Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода“, коју је предложила Наташа Шекуљица, дипл. инж., научно заснована и да представља значајан научни допринос научној области Технолошко инжењерство (ужа научна област Биотехнологија и биохемијско инжењерство) за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидату Наташи Шекуљици одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом.

За менторе при изради докторске дисертације предлажу се др. Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду и др. Душан Мијин, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 07.09.2015.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

.....
Проф. Др Душан Мијин,
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

.....
Проф. Др Бранимир Гргур,
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

.....
Проф. др Радивоје Продановић,
Хемијски факултет Универзитета у Београду

.....
Др Невена Прлаиновић,
Иновациони Центар, Универзитета у
Београду, Технолошко-металуршки факултет