

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ  
ФАКУЛТЕТ  
35/257  
(Број захтева)

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ НАУКА  
(Назив већа научне области и коме се захтев упућује)

26.05. 2016.  
(Датум)

## ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

**„Имобилизација ензима на наночестице  $\text{SiO}_2$  модификоване органосиланима“.**  
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

КАТАРИНА (Миодраг) БАЊАНАЦ, мастер инж.

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање: Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

3. Година дипломирања: 2012.

4. Назив и седиште факултета на коме је стекао мастер образовање: Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

5. Година дипломирања: 2013.

6. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена: /  
Студент је уписан на докторске академске студије шк. 2013/2014. године.

Обавештавамо Вас да је Наставно-научно веће,  
(назив надлежног тела Факултета)

на седници одржаној 26.05.2016. године размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

---

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

## ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата Катарина Бањанац

Име и презиме ментора: Дејан Безбрадица

Звање: \_\_\_\_\_ ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Bezbradica D., Mateo C., Guisan J.M. (2014) Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 102: 218-224. (ISSN: 1381-1177; IF=2,745)
2. Mihailović M., Stojanović M., Banjanac K., Carević M., Prlainović N., Milosavić N., Bezbradica D. (2014) Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A 109 and its post-immobilization stabilization. *Process Biochemistry* 49: 637-646. (ISSN: 1359-5113; IF=2,524).
3. Prlainović N., Knežević-Jugović Z., Mijin D., Bezbradica D. (2011) Immobilization of lipase from *C. rugosa* on Sepabeads®: the effect of lipase oxidation by periodates. *Bioprocess Biosystems Engineering* 34: 803-810. (ISSN: 1615-7591; IF=2,060)
4. Carević M., Ćorović M., Mihailović M., Banjanac K., Milisavljević A., Veličković D., Bezbradica D. (2016) Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. *International Dairy Journal* 54: 50-57. (ISSN: 0958-6946; IF za 2014: 2,008)
5. Prlainović N., Bezbradica D., Knežević-Jugović Z., Stevanović S., Avramov-Ivić M., Uskoković P., Mijin D. (2013) Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19: 279-285. (ISSN: 1226-086X; IF=2,145)

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

**А)** У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

**Б)** У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће,

на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као М11, М12, М13, М14, М41 и М51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односно дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 23.05.2016.

М.П.

---

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

## ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата Катарина Бањанац

Име и презиме ментора: Александар Маринковић

Звање: \_\_\_\_\_ доцент \_\_\_\_\_

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Banjanac Katarina, Mihailović Mladen, Prlainović Nevena, Stojanović Marija, Carević Milica, **Marinković Aleksandar**, Bezbradica Dejan, *Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 91 (2016) 439-448; DOI: 10.1002/jctb.4595; IF 2,349 (2014); ISSN 0268-2575.
2. Nevena Ž. Prlainović, Dejan I. Bezbradica, Jelena R. Rogan, Petar S. Uskoković, Dušan Ž. Mijin, **Aleksandar D. Marinković**, *Surface functionalization of oxidized multi-walled carbon nanotubes: Candida rugosa lipase immobilization*, Comptes Rendus Chimie, 19 (3) (2016) 363–370, doi:10.1016/j.crci.2015.10.008; IF 1,713 (2014); ISSN 1631-0748.
3. Katarina Banjanac, Mladen Mihailović, Nevena Prlainović, Marija Ćorović, Milica Carević, **Aleksandar Marinković**, Dejan Bezbradica, *Epoxy-silanization – tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity*, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, (Article in press), DOI: 10.1002/jctb.4870, IF 2,349 (2014) ISSN 0268-2575.
4. M. Čolić, T. Džopalić, S. Tomić, J. Rajković, R. Rudolf, G. Vuković, **A. Marinković**, P. Uskoković, *"Immunomodulatory effects of carbon nanotubes functionalized with a Toll-like receptor 7 agonist on human dendritic cells"*, Carbon 67 (2014) 273-287; doi:10.1016/j.carbon.2013.09.090.; IF 6,196 (2014); ISSN 0008-6223.
5. Jelena D. Rusmirović, Tijana Radoman, Enis Džunuzović, Jasna Džunuzović, Jasmina Markovski, Pavle Spasojević, **Aleksandar Marinković**, *Effect of the modified silica nanofiller on the mechanical properties of unsaturated polyester resins based on recycled polyethylene terephthalate*, Polymer Composites, early view, (2015); DOI: 10.1002/pc.23613; IF 1,632 (M21); ISSN 0272-8397.

(Приложити списак радова ментора у задњих 10 година који су у вези са научном облашћу дисертације, на одговарајућем формулару Универзитета. Уз сваки рад навести импакт фактор часописа за одговарајућу годину и ISSN број часописа. Предложени ментор мора бити првопотписани члан Комисије за оцену подобности теме и кандидата за израду дисертације.набројати радове који ментора квалификују за вођење докторске дисертације а да су објављени у последњих 10 година.)

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

**А)** У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

**Б)** У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

**В)** У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

**Г)** У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 20.05.2016.

М.П.

---

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ДП

На основу чл. 30. став 3. Закона о високом образовању, чл. 40. Статута ТМФ-а и чл. 32. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 26.05.2016. године, донета је

## О Д Л У К А

о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата  
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације КАТАРИНЕ БАЊАЦ, мастер инж., под називом: „Имобилизација ензима на наночестице SiO<sub>2</sub> модификоване органосиланима“.

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За ментора се одређују: Др Дејан Безбрадица, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Александар Маринковић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Одлуку доставити: Универзитету у Београду на сагласност, кандидату, менторима, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**Предмет:**Подобност теме и кандидата Катарине Бањанац, мастер инж. технологије, за израду докторске дисертације

Одлуком Технолошко-металуршког факултета бр. 35/166од14.04.2016. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Катарине Бањанац, мастер инж. технологије, а за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **"Имобилизација ензима на наночестице SiO<sub>2</sub> модификоване органосиланима"**.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

## **РЕФЕРАТ**

### **1. Подаци о кандидату**

#### **1.1.Биографски подаци**

Катарина Бањанац рођена је 10.12.1984. године у Ваљеву, где је завршила основну школу Милован Глишић и Ваљевску гимназију. Основне студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2008/2009. године. Дипломирала је на ТМФ-у на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију школске 2011/2012. године са оценом на дипломском раду 10 (десет) и просечном оценом у току студија 9,12. Мастер студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију је уписала школске 2012/2013. године., које је завршила са просечном оценом 9,88 и одбранила мастер рад са оценом 10 (десет) 13.07.2013. године.Докторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију уписала је 2013. године.

#### **1.2. Сечено научноистраживачко искуство**

Катарина Бањанацдокторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуршког факултета, под менторством др Дејана Безбрадице, ван. проф., уписала је 2013. године. Положила је све испите предвиђене планом и програмом последипломских студија Технолошко-металуршког факултета у Београду са просечном оценом 10,00 укључујући и завршни испит.Следи списак положених испита са бројем остварених ЕСПБ бодова:

| Предмет                                                                      | ЕСПБ | Оцена |
|------------------------------------------------------------------------------|------|-------|
| 1. Одабрана поглавља нумеричке анализе                                       | 5    | 10    |
| 2. Хемијска кинетика                                                         | 5    | 10    |
| 3. Одабрана поглавља биохемије - витамини                                    | 5    | 10    |
| 4. Биохемијска кинетика                                                      | 5    | 10    |
| 5. Индустриска микробиологија                                                | 5    | 10    |
| 6. Биомаса као извор енергије                                                | 4    | 10    |
| 7. Хемија физиолошки активних једињења                                       | 5    | 10    |
| 8. Имобилисани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена | 6    | 10    |
| 9. Нискотемпературни керамички процеси                                       | 5    | 10    |
| 10. Биоактивне материје у козметичким производима                            | 4    | 10    |
| 11. Одабрана поглавља пројектовања процеса у биохемијском инжењерству        | 5    | 10    |
| 12. Енглески језик                                                           | 0    | 10    |
| 13. Завршни испит                                                            | 30   | 10    |

На седници Наставно-научног већа Технолошко металуршког факултета од 14.04.2016. именована је Комисија за оцену подобности теме и кандидата Катарине Бађанац за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **"Имобилизација ензима на наночестице SiO<sub>2</sub> модификоване органосиланима"**.

Катарина Бађанац изабрана је у звање истраживач сарадник 10.7.2015. године. Коаутор је четири рада у часописима међународног значаја (четири M21) и три саопштења на домаћим и међународним скуповима (два M34, један M63).

### Објављени научни радови и саопштења

#### Научни радови у врхунским међународним часописима (M<sub>21</sub>)

1. **Banjanac K.**, Mihailović M., Prlainović N., Carević M., Stojanović M., Marinković A., Bezbradica D.: *Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase*, -Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol 9, No 2, 2016, pp. 439-448.
2. **Banjanac K.**, Mihailović M., Prlainović N., Carević M., Stojanović M., Marinković A., Bezbradica D.: *Epoxy-silanization – tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity*, -Journal of Chemical Technology and Biotechnology, january 2016, in press, DOI: 10.1002/jctb.4870.

- CarevićM., ĆorovićM., MihailovićM., **BanjanackK.**, MilisavljevićA., VeličkovićD., BezbradicaD.: *Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified beta-galactosidase from Aspergillus oryzae immobilised onto macroporous amino resin*, -International Dairy Journal, Vol 54, No 1, 2016, pp. 50-57.
- MihailovićM., StojanovićM., **BanjanackK.**, CarevićM., PrlainovićN., MilosavićN., BezbradicaD.: *Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite A109 and its post-immobilization stabilization*, -Process Biochemistry, Vol 49, No 4, 2014, pp. 637-646.

#### **Саопштења са међународног скупа штампано у целини (M34)**

- PrlainovićN., StojanovićM., CarevićM., MihailovićM., **BanjanackK.**, MarinkovićA., BezbradicaD.: *Two-step modification of silica nanoparticles for covalent lipase immobilization*, -8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013, BS-NS P001, CD Proceedings, ISBN 978-86-7132-053-5.
- MihailovićM., CarevićM., StojanovićM., PrlainovićN., **BanjanackK.**, BezbradicaD.: *Chemical modification of Purolite A109 for application in lipase immobilization*, -8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Beograd 2013, F P34, CD Proceedings, ISBN 978-86-7132-053-5.

#### **Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M63)**

- MihailovićM., **BanjanackK.**, StojanovićM., PrlainovićN., JakovetićS., CarevićM.: *Stabilizacija imobilisane lipaze iz Candida rugosa tretmanom imobilizata aminokiselinama*, -Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd 2012, CD Knjiga radova, ISBN: 978-86-7132-051-1, str. 82-85.

#### **1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми**

На основу досадашњег рада и постигнутих резултата током последипломских студија, Катарина Бањанац, мастер инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Такође, тема докторске дисертације припада области имобилизације ензима којом се кандидаткиња бавила и током израде завршног рада из којег је проистекао један рад у врхунском међународном часопису (M21), једно саопштење са међународног скупа штампано у целини (M34) и једно саопштење са националног скупа штампано у целини (M63) којих је коаутор. Коаутор је једног саопштења са скупа међународног значаја штампано у целини (M34) проистеклог из рада на мастер раду. У оквиру научно-истраживачког рада у току докторских студија објавила је два рада (као први аутор) у врхунском међународном часопису (M21) која су део истраживања у оквиру предложене докторске дисертације, што упућује на закључак да је кандидаткиња врло компетентна за рад на предложеној теми докторске дисертације. Њену изразиту склоност и компетентност за научно-истраживачки рад поврћује и чињеница да је коаутор још два рада у врхунским међународним часописима (M21) који нису интегрални део будуће дисертације.

## **2. Предмет и циљ истраживања**

Предмет истраживања ове докторске дисертације је хемијска модификација SiO<sub>2</sub> наночестица реакцијом силанизације како би се добили погодни носачи за имобилизацију индустријских ензима. Основни циљ је добијање нових имобилисаних ензимских препарата липазе из *Candida rugosa*,  $\beta$ -галактозидаза из бактерије *Lactobacillus acidophilus* и плесни *Aspergillus oryzae* и протеаза из бактерије *Bacillus licheniformis* и плесни *Aspergillus*

*oryzae*, који ће у односу на постојеће препарате имати повећану каталитичку активност, оперативну и термичку стабилност и измењену селективност.

Имобилизација ензима подразумева везивање ензима физичким или хемијским путем на површину носача или „заробљавање“ унутар структуре носача. Имобилизацијом се често добија ензим повећане каталитичке активности и/или стабилности у односу на слободни ензим, а омогућава се и олакшано изоловање ензима из реакционе смеше и употреба у више реакционих циклуса чиме се директно смањује цена ензимских процеса на индустријском нивоу. Постоји више метода за имобилизацију ензима, али најчешће се користе имобилизација путем физичке адсорпције ензима и имобилизација путем стварања ковалентних веза између функционалних група носача и ензима. У досадашњој пракси за имобилизацију ензима употребљавани су различити конвенционални носачи чије су димензије веће од 300  $\mu\text{m}$ , и који могу бити природни или синтетски, органског или неорганског порекла. Последњих година све више се као носачи за имобилизацију ензима користе природни или синтетски наноматеријали. Наноматеријали су производи нанотехнологија, састоје се од честица чије су димензије мање од 100 нм. Тренутно се у литератури може пронаћи неколико типова наноматеријала који се користе као носачи за имобилизацију ензима као што су нпр. наноцеви, нановлакна, наночестице (порозне и непорозне), нанокомпозитни материјали, материјали добијени сол-гел трансформацијама који садрже честице нано-димензија и “single-enzyme” наночестице. Показало се да примена наноматеријала омогућава добијање имобилизованих ензима веће активности, модификоване селективности и неупоредиво бољу стабилност у поређењу са ензимима имобилизованим на конвенционалне носаче. Због својих добрих карактеристика нанобиокатализатори су нашли примену у медицини, фармацији, текстилној индустрији и др. Међутим, велики трошкови и комплексна процедура синтезе наноматеријала су главне препреке за њихову ширу примену у процесима на индустријском нивоу.

Наночестице, од свих наведених типова наноматеријала имају најширу примену, а користе се као носачи за различите биомолекуле јер су хемијски стабилне, униформне величине, добро се диспергују у течностима и јако су корисне у процесима већих размера. Такође, наночестице поседују и карактеристике као што су велика специфична површина по јединици масе, минимална дифузиона ограничења, максимална количина везаног ензима, могућност хемијске модификације површине које их чине идеалним носачима за имобилизацију ензима.

Сам процес имобилизације ензима је веома сложен и зависи како од расподеле бочних аминокиселинских остатака на површини ензима тако и од оптималне концентрације функционалних група на површини носача. Веома је битно да присутне функционалне групе на површини носача имају велики афинитет према аминокиселинским остацима ензима, а да буду инертне према супстратима, производима реакције и растварачу. Како би се добили носачи са оптималном концентрацијом реактивних функционалних група прибегава се примени хемијских модификација површине носача. Хемијском модификацијом се може повећати број постојећих функционалних група или увести потпуно нове функционалне групе на површину носача. Најчешће се хемијском модификацијом уводе амино, епокси, карбоксилне и глутаралдехидне групе јер оне могу да реагују са функционалним групама ензима као што су  $\epsilon$ -амино групе, сулфидрилне групе и карбоксилне групе. Подједнако су важне и физичко-механичке особине носача које такође могу бити побољшане применом хемијске модификације површине што као резултат може да има ширу примену носача на индустријском нивоу.

У овој дисертацији радиће се на оптимизацији хемијске модификације непорозне пирогене наносиле (Aerosil 380, Evonik Industries, Essen, Немачка) ради њене примене као носача за имобилизацију ензима са идејом да се добију имобилизовани ензими повећане активности и стабилности. У почетним фазама истраживања биће примењена метода хемијске модификације (реакција силанизације) ради увођења нових функционалних група на површину  $\text{SiO}_2$  наночестица. Ове честице имају силанолне групе ( $-\text{SiOH}$ ) на својој површини

што даје могућност за коришћење органосилана као што су 3-(аминопропил)триметоксисилан и (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан као модификујућих агенаса. Одигравањем хемијске реакције између силанолних група на површини наночестица и метокси или етокси група органосилана, које су подложне хидролизи, долази до стварања –Si-O-Si- мостова што за резултат има увођење терминалних амино и епокси функционалних група на површину наночестица. Органосилани могу имати различите функционалне групе као што су хлоридна, тиолна, карбоксилна, цијано или амино, при чему ће у овој дисертацији бити коришћени органосилани са амино и епокси функционалним групама. Процес модификације ће бити оптимизован са аспекта постигнуте концентрације амино-група и епокси-група на површини наночестица у зависности од дужине трајања третмана и коришћеног масеног односа наночестица и одговарајућег силана. Силика наночестице модификоване аminosиланом ће потом бити третиране цијанурил-хлоридом. Поступак активације цијанурил-хлоридом биће оптимизован праћењем утицаја концентрације цијанурил-хлорида, температуре и дужине третмана на активност добијених имобилисаних ензима. FTIR спектроскопијом ће бити проучаване структуралне промене SiO<sub>2</sub> наночестица изазване модификацијом.

У другом делу ове дисертације ће бити оптимизована имобилизација различитих индустријских ензима (липазе, β-галактозидазе и протеазе) како на модификоване тако и на немодификоване SiO<sub>2</sub> наночестице. Пратићемо кинетику имобилизације (одређивањем масе везаних протеина и активности у току времена) као и утицај кључних параметара као што је јонска јачина раствора и однос концентрације ензима и носача на ефикасност имобилизације. У трећем делу ове дисертације, биће посматрана оперативна (могућност употребе у више реакционих циклуса) и термичка стабилност ензима имобилисаних на немодификоване и модификоване SiO<sub>2</sub> наночестице и упоређене са стабилношћу слободног ензима. Након завршене оптимизације имобилизације и одређивања оперативне и термичке стабилности, имобилисане липазе најбољих карактеристика ће бити коришћене у реакцији синтезе арома естара, док ће имобилисане β-галактозидазе бити коришћене у реакцији синтезе галактоолигосахарида. Добијене имобилисане протеазе ће бити коришћене у реакцији хидролизе сојиних производа.

Последњих година објављени су резултати бројних истраживања која се са различитих аспеката баве проблематиком имобилизације ензима на наночестице. 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. Cipolatti E. P., Silva M. J. A., Klein M., Feddern V., Feltes M. M. C., Oliveira J. V., Ninow J. L., de Oliveira D.: *Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization* -Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol 99, No 1, 2014, pp. 56-67.
2. Kim J., Grate J. W., Wang P.: *Nanostructures for enzyme stabilization* -Chemical Engineering Science, Vol 61, No 3, 2006, pp.1017-1026.
3. Yang H-H., Zhang S-Q., Chen X-L., Zhuang Z-X., Xu J-G., Wang X-R.: *Magnetite-Containing Spherical Silica Nanoparticles for Biocatalysis and Bioseparations* -Analytical Chemistry Vol 76, No 5, 2004, pp. 1316-1321.
4. Tan W., Wang K., He X., Zhao X. J., Drake T., Wang L., Bagwe R. P.: *Bionanotechnology based on silica nanoparticles* -Medicinal Research Reviews, Vol 24, No 5, 2004, pp. 621-638.
5. Popat A., Hartono S. B., Stahr F., Liu J., Qiao S. Z., Qing Lu G.: *Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers* -Nanoscale Vol 3, No 7, 2011, pp. 2801-2818.
6. Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B-H.: *Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability.* -Langmuir, Vol 20, No 24, 2004, pp. 10639-10647.

7. Dyal A., Loos K., Noto M., Chang S. W., Spagnoli C., Shafi K.V. P. M., Ulman A., Cowman M., Gross R. A.: *Activity of Candida rugosa Lipase Immobilized on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Magnetic Nanoparticles*, -Journal of the American Chemical Society Vol 125, No 7, 2003, pp. 1684-1685.
8. Cui Y., Li Y., Yang Y., Liu X., Lei L., Zhou L., Pan F.: *Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and application for lipase immobilization*, -Journal of Biotechnology, Vol 150, No 1, 2010, pp. 171-174.
9. Klein M. P., Nunes M. R., Rodrigues R. C., Benvenutti E. V., Costa T. M. H., Hertz P. F., Ninow J. L.: *Effect of the Support Size on the Properties of  $\beta$ -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles*, -Biomacromolecules Vol 13, No 8, 2012, pp. 2456-2464.
10. Verma M. L., Barrow C., Kennedy J. F., Puri M.: *Immobilization of  $\beta$ -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.
11. Li D., Teoh W. Y., Gooding J. J., Selomulya C., Amal R.: *Functionalization Strategies for Protease Immobilization on Magnetic Nanoparticles*, -Advanced Functional Materials Vol 20, No 11, 2010, pp. 1767-1777.
12. Sheng-nan W., Chao-ran Z., Bao-kun Q., Xiao-nan S., Lian-zhou J., *Immobilized alcalase alkaline protease on the magnetic chitosan nanoparticles used for soy protein isolate hydrolysis*, -European Food Research Vol 239, No 6, 2015, pp. 1051-1059.

### 3. Полазне хипотезе

Увидом у актуелну научну литературу, долази се до закључка да је све већи број експерименталних истраживања посвећен имобилизацији ензима на наноматеријале. Нанобиокатализатори имају све ширу примену, нарочито у медицини, фармацији, текстилној индустрији и др. Њихова предност је у томе штосу активнији и стабилнији од ензима имобилисаних на конвенционалне носаче. Велика пажња се посвећује синтези наноматеријала који се користе као носачи за имобилизацију ензима како би се добили материјали који су биокompatibilни, нетоксични и биодеградибилни. Треба напоменути да производи добијени употребом таквих нанобиокатализатора добијају епитет „зелених“, тј. еколошки прихватљивих. Липазе, галактозидазе и протеазе су врло значајни ензими у индустрији хране па је развој техника имобилизације ових ензима предмет многобројних истраживања. Најчешће примењиван вид имобилизације липаза, галактозидаза и протеаза је путем физичке адсорпције. Физичка адсорпција је најједноставнији и економски најповољнији вид имобилизације, међутим у већини случајева услед стварања слабих интеракција између ензима и носача долази до спирања ензима са носача током експлоатације чиме је онемогућена шира примена на индустријском нивоу. Због тога се све већа пажња посвећује ковалентној имобилизацији, а самим тим и носачима погодним за овај вид везивања ензима. Уколико носач не садржи одговарајуће функционалне групе за ковалентно везивање ензима, прибегава се методи хемијске модификације површине носача при чему долази до увођења нових реактивних функционалних група на њихову површину. Ковалентна имобилизација ензима обично омогућава добијање ензима веће стабилности него имобилизација адсорпцијом, док утицај на активност зависи од типа функционалне групе, распореда аминокиселинских остатака на површини ензима, карактеристика површине носача и услова средине.

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 липаза,  $\beta$ -галактозидаза и протеаза, представља могућност имобилизације. Имобилизација

се може сматрати успешном уколико се током имобилизације у потпуности или делимично сачува и/или повећа каталитичка функција ензима. Још једна предност имобилизације је могућност да се имобилисани ензим покаже стабилнијим од слободног тако на високим температурама или у присуству органских растварача. Ова карактеристика је од великог значаја за имобилизацију липаза и галактозидаза када се оне примењују у реакцијама естерификације и трансгалактозилације које се често одигравају у присуству органских растварача.

- Досада су за имобилизацију ензима коришћене честице већих димензија (од 300  $\mu\text{m}$  до неколико милиметара). Примена честица већих димензија оправдана је пре свега са становишта употребе у реакторима са пакованим и флуидизованим слојем. Међутим, примена оваквих честица у великом броју случајева доводи до дифузионих ограничења. Предности коришћења наночестица  $\text{SiO}_2$  као носача за имобилизацију ензима су велика контактна површина, одсуство дифузионих ограничења и могућност везивања велике количине ензима и драстично веће ензимске активности. Такође, другачије карактеристике површине могу да доведу и до повећања стереоселективности и могућности употребе имобилисаних ензима у раздвајању смеша оптичких изомера.
- Функционалне групе које се налазе на површини носача употребљеног за имобилизацију ензима као и методе и услови имобилизације од пресудног су значаја за добијање имобилизата оптималних карактеристика. Ако носач на својој површини нема функционалне групе које могу реаговати са аминокиселинским остацима ензима, може се применити метода хемијске модификације којом се на површину носача уводе реактивне функционалне групе. Површина  $\text{SiO}_2$  наночестица је јако хидрофилна јер се на њој налазе силанол групе, па се ензим за њих може везати искључиво адсорпцијом помоћу Ване дер Валсових сила или водоничних веза. Хемијском модификацијом, применом реакције силанизације, помоћу различитих органосилана на површину ових наночестица могу се увести различите органске функционалне групе као што су амино, епоксидне, фенолне, хлоридне и др. Увођењем функционалних група на површину наночестица ствара се могућност успостављања ковалентне везе између бочних аминокиселинских остатака ензима и уведених функционалних група и добијање имобилисаних ензима веће стабилности. Такође, увођењем различитих функционалних група може се утицати на промену хидрофобности површине наночестица, а самим тим и афинитета за везивање појединих ензима. Очекује се да ће повећање хидрофобности површине наночестица  $\text{SiO}_2$  повећати ефикасност имобилизације липаза јер често испољавају карактеристику активације на хидрофобним површинама.
- У досадашњој пракси показало се да се активни и стабилни имобилисани препарати липаза могу добити имобилизацијом липаза адсорпцијом на хидрофобне носаче, као и ковалентном имобилизацијом за носаче који на својој површини имају функционалне групе као што су нпр. епоксидне, карбонилне или хлоридне. За разлику од липаза,  $\beta$ -галактозидазама и протеазама за везивање више одговарају хидрофилнији носачи. У овој дисертацији ће бити примењена модификација  $\text{SiO}_2$  наночестица помоћу амино и епокси органосилана. Такође, уведене амино групе ће бити додатно третиране цијанурил-хлоридом при чему долази до увођења хлоридних група на површину наночестица. Испитаћемо утицај најважнијих фактора модификација (као што су температура, времена трајања реакције и концентрације амино, епокси органосилана и цијанурил-хлорида) из угла добијања што активнијих и стабилнијих имобилисаних препарата ензима.
- Могућности имобилизације липазе из *C. rugosa*,  $\beta$ -галактозидаза из *L. acidophilus* и *A. oryzae*, и протеаза из *B. licheniformis* и *A. oryzae* на немодификоване и модификоване наночестице  $\text{SiO}_2$  биће испитивана. Поређењем активности и стабилности имобилисаних ензима на немодификоване и модификоване  $\text{SiO}_2$  наночестице може се стећи увид у адекватност примене одређене методе модификације наночестица за имобилизацију конкретног ензима. Осим активности, неопходно је одредити и масу везаних протеина,

односно имобилизациони капацитет носача, да би се могла добити потпуна слика о ефектима модификације  $\text{SiO}_2$  наночестица одређеним органосиланом на њихов имобилизациони потенцијал и могућност примене у имобилизацијама других протеина.

- Могућност примене добијених имобилисаних ензима модификоване и немодификоване  $\text{SiO}_2$  наночестице најбољих карактеристика биће испитана у ензимским реакцијама добијања важних производа прехранбене индустрије као што су физиолошки активни липосолубилни естри, галактоолигосахариди или хидролизати протеина соје.

#### **4. Научне методе истраживања**

Учинак реакција модификације носача биће праћен одређивањем садржаја функционалних група на површини носача стандардним волуметријским методама. Поред квантитативне анализе, ефекти модификације носача биће проверени и спектроскопском анализом (FTIR, TGA и SEM). За анализу ефикасности имобилизације биће неопходно праћење концентрације протеина и активности липаза, галактозидаза и протеаза током имобилизације, које ће бити одређиване стандардним спектрофотометријским методама. Концентрација протеина биће одређивана спектрофотометријским методама по Бредфорду и Лорију, а активност методама хидролизе *p*-нитрофенил палмитата (*p*-NPP) за липазе, *o*-нитрофенил- $\beta$ -Д-галактопиранозида (*o*-NPG) за  $\beta$ -галактозидазу и казеина за протеазе. Активност  $\beta$ -галактозидаза у реакцијама синтезе галактоолигосахарида биће праћена течном хроматографијом високих перформанси (HPLC) помоћу аналитичке колоне за шећере (Hyper REZ XP Carbohydrate  $\text{Ca}^{2+}$ ), а детекција производа биће извршена помоћу рефрактометријског детектора (RID). Активност имобилисаних протеаза у реакцијама хидролизе сојиног брашна биће праћена нинхидринском методом, док ће активност имобилисаних липаза у реакцијама синтезе физиолошки активних естара бити праћена реверзно-фазном течном хроматографијом високих перформанси (RP-HPLC) помоћу одговарајуће колоне.

#### **5. Очекивани научни допринос**

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос на пољу примене хемијски модификованих наночестица за имобилизацију ензима са циљем добијања максималне активности и стабилности имобилисаних ензима.

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

- Развој најпогодније методе за модификацију  $\text{SiO}_2$  наночестица намењених имобилизацији липаза,  $\beta$ -галактозидаза и протеаза са аспекта активности и стабилности добијеног имобилисаног ензима.
- Оптимизација најбитнијих параметара модификације (температура, време реакције, концентрација агенса за модификацију) која омогућава довољну концентрацију функционалних група на површини наночестица, а да се истовремено избегну нежељене споредне реакције умрежавања које доводе до смањења активности имобилисаног ензима.
- Оптимизација параметара имобилизације (маса везаних протеина и активност) као испитивање утицаја кључних параметара као што је јонска јачина раствора и однос концентрације ензима и наночестица на ефикасност имобилизације.
- Развој имобилисаних ензима који се могу користити током више реакционих циклуса као и имобилисаних ензима који су стабилни на вишим температурама.
- Оптимизација примене имобилисаних ензима у реакцијама синтезе арома естара, галактоолигосахарида и хидролизе сојиног брашна.

## **6. План истраживања и структура рада**

Предмет истраживања ове дисертације је развој и оптимизација методе хемијске модификације површине наночестица реакцијом силанизације како би се добили адекватни носачи за имобилизацију са циљем добијања имобилисаних липаза,  $\beta$ -галактозидаза и протеаза повећане активности и стабилности. Током израде дисертације биће примењена немодификована и хемијски модификована непорозна пирогена наносилика као материјал који се може користити као носач за имобилизацију. Као модификујући агенси биће коришћени органосилани и цијанурил-хлорид. Хемијска модификација реакцијом силанизације треба да омогући добијање наночестица богатих реактивним функционалним групама, што омогућује ефикаснију имобилизацију 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:

- Преглед најчешће коришћених врста наноматеријала за имобилизацију,
- Синтезу, структуру, својства и примену непорозних, пироцених  $\text{SiO}_2$  наночестица,
- Преглед метода хемијске модификације површине  $\text{SiO}_2$  наночестица,
- Својства липаза, галактозидаза и протеаза која су од значаја за имобилизацију,
- Примену липаза, галактозидаза и протеаза.

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:

- Оптимизација параметара модификације органосиланима силика наночестица,
- Оптимизација параметара модификације цијанурил-хлоридом аминокиселинских модификованих силика наночестица,
- Оптимизација параметара имобилизације различитих ензима на немодификоване и модификоване силика наночестице,
- Испитивање стабилности имобилисаних ензима на повишеној температури,
- Испитивање оперативне стабилности, тј, могућности употребе у више узастопних циклуса,
- Испитивање могућности примене имобилизата у различитим реакцијама које имају индустријску примену.

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 „**Имобилизација ензима на наночестице SiO<sub>2</sub> модификоване органосиланима**” коју је предложила Катарина Бањанац, мастер инж. технологије, 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 кандидаткињи Катарини Бањанац одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. Због мултидисциплинарног карактера која обухвата области биохемијског инжењерства и биотехнологије и органске хемије Комисија предлаже да докторска дисертација има два ментора: др Дејана Безбрадицу, ванредног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду и др Александра Маринковића, доцента Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 28.04.2016.

### **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

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

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

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

.....  
Др Невена Прлаиновић, научни сарадник  
Универзитет у Београду,  
Иновациони центар Технолошко-металуршког  
факултета

.....  
Др Милица Ранчић, доцент  
Универзитета у Београду,  
Шумарски факултет