

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/89
(Број захтева)

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

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

21.04.2017.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

МИРЈАНА (Новак) РАДОВАНОВИЋ, дипломирани инжењер прехранбене технологије

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање: **Универзитет у Крагујевцу, Агрономски факултет у Чачку.**

3. Година дипломирања: 2008.

На захтев студента, а на основу поднетих докумената, декан је донео Решење број 05-29/10 од 27.03.2011. године којим је одобрено мировање права и обавеза студента у школској 2010/2011. години због неге детета до годину дана.

На захтев студента и уз сагласност ментора Наставно-научно веће је на седници одржаној 22.10.2015. године донело Решење број 35/516 којим му је одобрено продужење рока за завршетак студија за два семестра школске 2015/2016. године. На захтев студента, а на основу поднетих докумената, декан је донео Решење број 05-10/45 од 27.10.2015. године којим је одобрено мировање права и обавеза у школској 2015/2016. години због неге детета до годину дана.

На захтев студента и уз сагласност ментора декан је донео Решење број 20/129 од 06.10.2016. којим му је одобрено продужење рока за завршетак студија за два семестра школске 2016/2017. године.

Обавештавамо Вас да је **Наставно-научно веће**, на седници одржаној **20.04.2017. године** размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

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 20.04.2017. 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 **Мирјани Радовановић**, дипл. инж., под називом: „**Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином**“.

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

За ментора се одређује др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

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

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата Мирјану Радовановић

Име и презиме ментора: Зорица Кнежевић-Југовић

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Milašinović, N., **Knežević-Jugović, Z.**, Jakovljević, Ž., Filipović, J., Kalagasidis Krušić, M. (2012) Synthesis of *n*-amyl isobutyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized into poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels, Chemical Engineering Journal, 181-182, 614-623. ISSN: 1385-8947; IF(2012) 3,473; 10/133 Engineering, Chemical.
2. Damnjanović, J.J., Žuža, M.G., Savanović, J.K., Bezbradica, D.I., Mijin, D.Ž., Bošković-Vragolović, N., **Knežević-Jugović, Z.D.** (2012) Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 75, 50-59. ISSN: 1381-1177; IF(2012) 2,823; 48/135 Chemistry, Physical.
3. Radovanović, M., Jugović, B., Gvozdenović, M., Jokić, B., Grgur, B., Bugarški, B., **Knežević-Jugović, Z.** (2016) Immobilization of α -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline, Starch/Staerke, 68 (5-6), 427-435. ISSN: 0038-9056; IF(2015) 1,523; 58/125 Food Science & Technology.
4. **Knežević-Jugović, Z.D.**, Žuža, M.G., Jakovetić, S.M., Stefanović, A.B., Džunuzović, E.S., Jeremić, K.B., Jovanović, S.M. (2016) An approach for the improved immobilization of penicillin G acylase onto macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) as a potential industrial biocatalyst, Biotechnology Progress, 32(1), 43-53. ISSN: 8756-7938; IF(2015) 2,167; Food Science & Technology 34/125.
5. Gvozdenović, M.M., Jugović, B.Z., Bezbradica, D.I., Antov, M.G., **Knežević-Jugović, Z.D.**, Grgur, B.N. (2011) Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase, Food Chemistry, 124 (1), 396-400. ISSN: IF(2011) 3,655; 3/71 Chemistry, Applied; 6/128 Food Science & Technology.

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

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техникотехнолошких, 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 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: 20.04.2017

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Мирјане Радовановић за израду докторске дисертације

Одлуком бр. 35/663 од 29.12.2016. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата **Мирјане Радовановић** за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом:

**„Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама
модификованим полианилином“**

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Мирјана Н. Радовановић рођена је 14.07.1984. године у Ивањици где је завршила основну школу и гимназију. Агрономски факултет у Чачку Универзитета у Крагујевцу уписала је 2003. године, а дипломирала 2008. године на смеру Технологија пољопривредних и прехранбених производа са просечном оценом 9,15.

Дипломски рад на тему „Производња јабуковог сирћета уз помоћ квасца *Saccharomyces cerevisiae*“ одбранила је са оценом 10 (десет). Докторске студије уписала је 28.10.2008. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све предвиђене испите и Завршни испит са просечном оценом 9,73.

Положени испити и остварени бодови у току докторских студија Оцена ЕСПБ

1	Хемијска кинетика	8	5
2	Биохемијска кинетика	10	5
3	Течна хроматографија-масена спектрометрија	10	4
4	Структурна анализа органских молекула	10	6
5	Индустријска микробиологија	10	5
6	Одабрана поглавља биохемије – витамини	10	5
7	Одабрана поглавља математичке анализе	9	5
8	Санитарна микробиологија	10	4
9	Виши курс електрохемијског инжењерства	10	6

10	Виши курс аналитичке хемије	10	5
11	Завршни испит	10	30

Од 21.10.2008. године запослена је на Агрономском факултету у Чачку, Универзитета у Крагујевцу, као сарадник у настави. У звање асистента изабрана је 08.03.2011. године на истом факултету за ужу научну област Технологија биљних сировина. Тренутно је и даље запослена на Агрономском факултету у Чачку Универзитета у Крагујевцу у истом звању.

1.2. Стечено научно-истраживачко искуство

Национални пројекат:

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“, ИИИ 46010, Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, 2011-2017.

Из резултата досадашњег научно-истраживачког рада кандидата произашла су 2 (два) рада објављена у часописима међународног значаја (M20: 1 рад M22, 1 рад M23), 1 рад објављен у зборнику скупа међународног значаја штампан у целини (1 рад M33), 2 рада са међународног скупа штампана у изводу (2 рада M34), 6 радова објављених у зборницима скупова националног значаја (6 радова M63).

Објављени научни и стручни радови и саопштења на скуповима:

M22 рад у истакнутом часопису међународног значаја:

1. **Radovanović M.**, Jugović B., Gvozdеновић M., Jokić B., Grgur B., Bugarski B., Knežević-Jugović Z.: *Immobilization of α -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline*, Starch - Stärke, 68, 2016, 427–435. ISSN 1521-379X (IF 1,523).

M23 рад у часопису међународног значаја:

1. **Radovanović M.**, Račić B., Tanasković S., Marković G., Tomić D., Pantović J.: *The catalytic effect of honey on formation of reducing sugars during sucrose hydrolysis*, Hemijska industrija, 2016, DOI:10.2298/HEMIND140313068R. ISSN 2217-7426 (IF 0,437).

M33 рад саопштен на скупу међународног значаја штампан у целости

1. Pantović J., Bogdanović M., **Radovanović M.**: *Sensory and chemical evaluation of plum, apricot and pear distillates*, - Book of proceedings, Fourth International Agronomic Symposium „Agrosym 2013“, October 3-6, editor in chief Dušan Kovačević, Faculty of Agriculture East Sarajevo, pp. 625-629, ISBN 978-99955-751-3-7.

M34 радови саопштени на скупу међународног значаја штампани у изводу

1. Tomić D., Stevović V., Đurović D., **Radovanović M.**, Lazarević Đ., Dokić N., Knežević J.: *The effect of foliar application cobalt, boron, phosphorus and potassium on the chlorophyll content in leaf and nodulation of red clover*, - Book of Abstracts, Sixth International Scientific Agricultural Symposium „Agrosym 2015“, October 15 - 18, 2015, editor in chief Dušan Kovačević, Faculty of Agriculture East Sarajevo, pp. 267. ISBN 978-99976-632-1-4.

2. **Radovanović M.**, Stefanović M., Radojičić D.: *Honey quality of Moravički region*, -Book of Abstracts, I International Symposium and XVII Scientific conference of agronomists of Republic of Srpska, March 19-22, 2012, Trebinje, pp.74. ISBN 978-99938-93-20-2.

M63 radovi saopштени na skupu nacionalnog značaja štampani u celosti

1. **Radovanović M.**, Đurović V., Gvozdenović M., Jugović B., Grgur B., Knežević-Jugović Z.: *Uticaj veličine čestica polianilina na imobilizaciju alfa-amilaze*, - Zbornik radova, XXII savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak 2017, Vol 22 (26), pp. 527-534. ISBN 978-86-87611-49-8.
2. Radojičić D., **Radovanović M.**, Marković G.: *Bromatološke analize studentskih obroka u studentskom centru Čačak*, - Zbornik radova, XX savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak 2015, Vol 20(22), pp. 321-325. ISBN 978-86-87611-35-1.
3. Marković G., Lujčić J., Pantović J., **Radovanović M.**, Mašković P.: *Biljna ulja u ishrani riba*, Zbornik radova, XIX savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak 2014, Vol 19(21), pp. 435-439. ISBN 978-86-87611-31-3.
4. **Radovanović M.**, Račić B., Knežević-Jugović Z.: *Uticaj vremena i početne koncentracije alfa-amilaze na imobilizaciju na magnetnim česticama polianilina*, Zbornik radova, XVIII savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak 2013, Vol 18(20), pp. 489-494. ISBN 978-86-87611-29-0.
5. Radojičić D., **Radovanović M.**, Jeknić D., Radovanović I., Brković D.: *Značaj upotrebe surutke u prahu u proizvodnji nekih konditorskih proizvoda*, Zbornik radova, XVII Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak 2012, Vol 17(19) pp. 425-429. ISBN 978-86-87611-23-8.
6. **Radovanović M.**, Knežević-Jugović Z., Radojičić D.: *Primena ELS detektora u rutinskim analizama ugljenih hidrata tečnom hromatografijom*, Zbornik radova, XVII Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak 2012, Vol 435-439. ISBN ISBN 978-86-87611-23-8.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током докторских студија и у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, Мирјана Радовановић, дипл.инж. технологије, показала је интерес и способност за бављење научно-истраживачким радом. Тема докторске дисертације припада области из које је до сада објавила један научни рад у часопису водећег међународног значаја и два саопштења на скупу националног значаја.

На основу досадашње сарадње са кандидатом као и објављених научних радова, Комисија сматра да кандидат испуњава све потребне услове за рад на предложеној теми.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет научног истраживања у оквиру предложене теме је развој имобилисаног система са алфа-амилазом на полианилину као и на магнетним честицама модификованим полианилином са побољшаним својствима у реакцији од практичног значаја као што је хидролиза скроба.

Развојем ензимских технологија омогућена је примена ензима у најразличитијим областима. Имобилизацијом ензима могу се добити стабилни бикатализаторски

системи за виšekратну употребу у шаржним или дуготрајну употребу у континуалним процесима. Данас је захваљујући примени савремених техника могуће синтетисати, окарактерисати и врло прецизно модификовати честице носача у циљу добијања носача побољшаних перформанси за имобилизацију ензима. Исто тако, на основу познавања структуре ензима, садржаја и положаја одређених хемијских група у молекулу, преко којих се жели остварити везивање са носачем, могуће је површину честица циљано хемијски модификовати да би се ензим везао преко селектованих група и тиме добио активнији и стабилнији биокатализатор. Овој области се у свету већ неколико деценија посвећује велика пажња и објављује велики број радова, који се баве утицајем врсте и величина честица носача на имобилизацију ензима, на каталитичку активност, стабилност биокатализатора, али и тумачењем типа успостављених интеракција између ензима и носача.

Неоргански носачи попут оксида гвожђа могу имати предности у поређењу са другим материјалима због велике термичке и механичке отпорности, смањене микробиолошке контаминације и магнетних својстава што је, нарочито, значајно код имобилизованих ензима, где се као основна њихова предност у односу на нативне ензиме истиче олакшана сепарација из реакционе смеше и виšekратна примена. Међутим, због малог броја функционалних група на овим неорганским носачима не може се везати довољна количина ензима, нити наградити повољно микроокружење за ензим, што би довело до унапређења његових каталитичких својстава. Зато се облагањем магнетних честица додатном превлаком од неког органског полимера са већим бројем функционалних група, као што је полианилин, потенцијално може везати већа количина ензима и постићи чвршће везивање. Полианилин је због лаке синтезе, механичке флексибилности и хемијске стабилности изузетно погодан као носач за имобилизацију ензима, а полимеризацијом на магнетним честицама обезбеђује повољнију микрооколину за везивање ензима од самих магнетних честица.

Алфа-амилаза (1,4- α -глюкан глюканохидролаза, ЕС 3.2.1.1) је ензим који катализује хидролизу скроба и сличних макромолекула по ендомеханизму, при чему настају малтодекстрини са различитим бројем глюкозних остатака. То је први ензим који је почео комерцијално да се производи још 1890. године. Алфа-амилазе пореклом из различитих микроорганизама користе се у пекарској, индустрији пива, скробних хидролизата, производњи сокова. Поред прехранбене индустрије, алфа-амилаза се примењује у текстилној и папирној индустрији, индустрији детергената, фармацији, медицини итд. У индустрији прераде скроба алфа-амилаза данас је незаменљива и готово да је потпуно потиснула класичну киселинску хидролизу. Имобилизација алфа-амилазе на инертне честице чврстог носача обезбеђује исплативост њене комерцијалне употребе, јер се ензим може издвојити из реакционог медијума и употребити у више производних циклуса. У литератури постоји велики број података о различитим материјалима који су се користили за имобилизацију овог ензима, као и о утицају облика, морфологије, величине носача, броја и врсте функционалних група на имобилизацију алфа-амилазе. Полианилин је захваљујући лакој синтези, инертности, стабилности, електропроводљивости и ниској цени нашао широку примену за имобилизацију ензима. Испитивања имобилизације трипсина, глюкозо-оксидазе, липазе и других ензима на честицама полианилина јасно су показала да се добијају биокатализатори побољшаних својстава. Међутим, имобилизација алфа-амилазе на полианилину није довољно проучена. Исто тако, у литератури има свега неколико радова који се односе на имобилизацију алфа-амилазе на нано/микро-магнетним честицама при чему су ови системи испитани са аспекта примене као носачи у афинитетној хроматографији или биосензорима, док о системима алфа-амилазе

имобилисане на Fe_2O_3 /полианилину и њиховој примени као катализатора у хидролизи скроба нема података.

Савремена производња захтева добијање вишефункционалних биокатализаторских система. Значајна карактеристика имобилизата јесте његова лака сепарација из реакционог система. У том смислу биокатализаторски системи магнетних својстава су атрактивни, где је већ велики број аутора испитивао оптималне услове имобилизације различитих ензима на магнетним честицама и магнетним честицама различито модификованим као што су: карбоксилване магнетне наночестице, магнетне честице модификоване аминима, пресвучене целулозом, модификоване адипинском киселином итд. Нека истраживања су показала да полимерна превлака магнетних честица обезбеђује повољну микрооколину за имобилизацију ензима. Полимер може да спречи сувишно отварање ензима, штити га од конформационих промена чиме позитивно утиче на ензимску активност.

У оквиру тезе планирано је да се синтетишу четири врсте носача и то хематит (Fe_2O_3), полианилин хемијским путем, полианилин електрохемијским путем и хематит/полианилин и испита имобилизација алфа-амилазе на овим носачима под различитим условима. У раду је предвиђено испитивање неколико метода имобилизације у циљу добијања биокатализатора са жељеним карактеристикама у хидролизи скроба. При томе, предност ће имати адсорпција, као једна од најмање агресивних метода, која омогућава добијање активних ензимских препарата у доста широком интервалу процесних услова. Као параметри који утичу на активност и стабилност биокатализатора разматраће се они који се генерално сматрају најважнијим за имобилизацију адсорпцијом и то: величина честица, морфологија и друга својства носача, почетна концентрација ензима, температура, рН, јонска јачина пуфера, маса везаног ензима на носачу и време адсорпције. Утврдиће се механизам и кинетика везивања ензима на носачима, док ће се на основу адсорпционих изотерми одређених на неколико температура утврдити термодинамички параметри на основу којих ће се поредити системи. Поред тога, ова истраживања ће омогућити увиде у природу интеракција између молекула ензима и носача, што ће се упоредити са резултатима добијеним Фуријеовом трансформационом инфрацрвеном (FTIR) спектроскопијом.

Каталитичка активност биокатализатора добијених са различитим носачима и при различитим условима биће испитана у реакцији хидролизе скроба у шаржном систему. На основу класичних испитивања почетне кинетике ензимских реакција одредиће се вредности кинетичких параметара, Михаелисове константе (K_m) и максималне брзине реакције (v_m) и упоредити системи. Испитиваће се и остала својства имобилисане алфа-амилазе попут рН профила, температурног профила, термалне стабилности са посебним освртом на утицај полианилинске превлаке на стабилност и активност алфа амилазе имобилисане на магнетним честицама. Неопходно је експериментално испитати и теоријски објаснити утицај величине, морфологије, хемијског састава носача као и ефекте полимерне превлаке носача на каталитичке особине и стабилност биокатализаторског система.

Циљ ове дисертације је да се добије активан биокатализаторски систем са повећаном термичком и оперативном стабилности, што је веома битно за практичну примену, нарочито при узастопном извођењу хидролизе скроба у шаржном реактору, или при континуалном извођењу реакције у проточним реакторима. Да би се обезбедило лако заустављање реакције и издвајање имобилизата из реакционог медијума, од нарочитог значаја су честице магнетних својстава које омогућавају олакшану манипулацију биокатализатором и издвајање из реакционог система дејством спољашњег магнетног поља. Међутим, у току примене биокатализатора може доћи до нежељених губитака активности ензима услед спирања ензима са носача или

денатурације ензима топлотом или под утицајем микрооколине носача. У том смислу потребно је испитати утицај величине честица, морфологије, зета потенцијала, магнетних својстава, дебљине полианилинске превлаке, што се може мењати у широком распону променом параметара и начина синтезе, и стабилности имобилисане алфа-амилазе.

Са аспекта индустријске примене од значаја је испитати и утицај јона калцијума на активност и стабилност имобилисаних ензима, с обзиром да је алфа-амилаза метало-ензим у чији састав улазе јони Ca^{2+} . Углавном у присуству Ca^{2+} јона алфа-амилазе постају термички стабилније. Међутим, на расподелу јона у систему може да утиче носач тако да ефективна концентрација јона калцијума буде већа/мања у микрооколини ензима, односно оптимална концентрација калцијумових соли се мења у имобилисаним системима у поређењу са нативном алфа-амилазом. На овај начин имобилисана алфа-амилаза може показати исту или чак већу активност и при мањој концентрацији Ca^{2+} јона од нативне алфа-амилазе, што је пожељно посебно у производњи скробних хидролизата у фазама прераде када је потребно уклањање јона Ca^{2+} из добијених производа. Имобилисани системи ће бити разматрани у овој тези и са овог аспекта.

Један од највећих проблема у раду са имобилисаним ензимима је губитак каталитичке активности услед дифузионих отпора, који су нарочито изражени у случају алфа-амилазе која делује на макромолекуле попут скроба. Да би се унапредио пренос масе у овим хетерогеним системима, потребно је повећати локално кретање флуида око честица, што се обично постиже механичким мешањем у шаржним или повећањем протока у континуалним системима. Међутим, интензивно механичко мешање може оштетити честице, убрзати спирање ензима са носача као и изазвати денатурацију ензима услед дејства смицајних сила. У том смислу честице са феромагнетним или супермагнетним својствима, чије би се мешање унутар реактора могло контролисати различитим екстерним магнетним пољем су од великог значаја. У оквиру рада планирано је да се упореде каталитичка својства алфа-амилазе имобилисане на хематит/полианилин честицама у шаржном реактору са механичким мешањем и реактору са мешањем уз помоћ спољашњег магнетног поља.

У складу са предметом дисертације научни циљеви су следећи:

- 1) развој ефикасног имобилисаног система са алфа-амилазом за хидролизу скроба адсорпцијом ензима на магнетним честицама и/или полианилину са аспекта активности биокатализатора, термичке и оперативне стабилности;
- 2) утврђивање структурних, морфолошких и магнетних својстава честица добијених применом различитих метода синтезе и различитих услова;
- 3) оптимизација улова имобилизације алфа-амилазе на полианилину, магнетним честицама и магнетним честицама модификованим полианилином;
- 4) утврђивање утицаја величине, морфологије, хемијског састава носача као и ефекте полимерне превлаке на каталитичке особине и стабилност биокатализаторског система;
- 5) утврђивање кинетике адсорпције алфа-амилазе на различитим носачима и одређивање термодинамичких и кинетичких параметара који ће дати увиде у механизме адсорпције ензима и податке о капацитетима носача на основу којих ће се вршити поређење система;
- 6) оптимизација хидролизе скроба имобилисаном алфа-амилазом из *B. licheniformis* на одабраном носачу у шаржном и реактору са пакованим слојем;

- 7) утврђивање кинетике реакције катализоване у систему са слободним и имобилисаним ензимом под претходно одређеним оптималним условима реакције као и утврђивање механизма одвијања реакције на основу добијених кинетичких резултата у оба система;
- 8) Утврђивање термичке стабилности одабраних биокатализатора у условима индустријске хидролизе скроба (100 °C) као и утицаја јона калцијума на термичку стабилност биокатализатора;
- 9) утврђивање оперативне стабилности биокатализатора у поновљеним циклусима у шаржном реактору са механичким мешањем,
- 10) утврђивање утицаја механичког мешања на абразију честица као и спирање ензима са носача, као и могућности примене алтернативних поступака мешања уз помоћ спољашњег магнетног поља;
- 11) дефинисање најефикаснијег имобилисаног система са алфа-амилазом из *B. licheniformis* за хидролизу скроба, што подразумева избор методе и параметара синтезе честица, утврђивање оптималних параметара при имобилизацији ензима, и дефинисање оптималних технолошких параметара, конфигурације реактора, начина и режима мешања при узвођењу реакције хидролизе скроба са имобилисаним ензимом.

У наставку су наведени неки радови у вези са синтезом полианилина, магнетних честица и имобилизацијом алфа-амилазе.

1. He, L., Mao, Y., Zhang, L., Wang, H., Alias, S.A., Gao, B., Wei, D., *Functional expression of a novel α -amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization*, BMC Biotechnology, 17 (1), 2017, art. no. 22.
2. Sun Y., MacDiarmid A. G., Epstein A. J., *Polyaniline: synthesis and characterization of pernigraniline base*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., Vol 7, 1990, pp. 529-531.
3. Gvozdenović M., Jugović B., Stevanović J., Trišović T., Grgur B., *Electrochemical polymerization of aniline*, Electropolymerization, Ewa Schab-Balcerzak (Ed.), ISBN: 978-953-307-693-5, chapter 4, InTech, 2011., pp 77-96.
4. Pron A., Genoud F., Menardo C., Nechtschein M., *The effect of oxidation conditions on the chemical polymerization of polyaniline*, -Synth. Met., Vol 24, No 3, 1988, pp. 193-201.
5. Ertan F., Yagar H., Balkan B., *Optimization of alpha-amylase immobilization in calcium alginate beads*, -Prep. Biochem. Biotechnol., Vol 37, No 3, 2007, pp. 195-204.
6. Ashly P.C., Joseph M. J., Mohanan P. V., *Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs)*, -Food Chemistry, Vol 127, 2011, 1808–1813.
7. Khan, M. J., Husain, Q., Ali Ansari, S., *Polyaniline-assisted silver nanoparticles: a novel support for the immobilization of α -amylase*. -Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol 97, 2013, pp. 1513–1522.
8. Johnson A. K., Zawadzka A. M., Deobald L. A., Crawford R. L., Paszczynski A. J., *Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles*, -J. Nanopart. Res., Vol 10, 2008, pp. 1009-1025.
9. Konwarh R., Karak N., Rai S. K., Mukherjee A. K., *Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase*, -Nanotechnology, Vol 20, 2009, 225–235.
10. Temoc Z., *Immobilization of α -amylase on reactive modified fiber and its application for continuous starch hydrolysis in a packed bed bioreactor*, -Starch /Stärke, Vol 66, pp. 376–384.
11. Baysal Z., Bulut Y., Yavuz M., Aytekin C., *Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: Determination of equilibrium, kinetics and thermodynamic parameters*, -Starch /Stärke, Vol 66, 2014, pp. 484–490.

12. Sohrabi N., Rasouli N., Torkzadeh M., *Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe_3O_4 nanoparticles*. -Chemical Engineering Journal, Vol 240, 2014, pp. 426–433.
13. Fernandes K. F., Lima C. S., Pinho H., Collins C. H., *Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers*, -Process Biochemistry, Vol 38, 2003, pp. 1379-1384.
14. Khan M. J., Husain Q., Azam A., *Immobilization of porcine pancreatic α -amylase on magnetic Fe_2O_3 nanoparticles: Applications to the hydrolysis of starch*, -Biotechnology and Bioprocess Engineering, Vol 17, 2012, pp. 377-384.
15. Wang S., Bao H., Yang P., Chen G. *Immobilization of trypsin in polyaniline-coated nano- Fe_3O_4 /carbon nanotube composite for protein digestion*, -Analytica Chimica Acta, Vol 612, 2008, 182–189.
16. Maciel J. C., Mercês A. A. D., Cabrera M., Shigeyosi W. T., Souza S. D., Olzon-Dionysio M., Fabris J. D., Cardoso C. A., Neri D. F. M, Silva MPC, Carvalho L B Jr. *Magnetic nanoparticles coated with polyaniline to stabilize immobilized trypsin*, Hyperfine interact, Vol 237, No 3, 2016, pp. 3.
17. Hosseinipour S. L., Khiabani M.S., Hamishehkar H., Salehi R., *Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe_3O_4 nanoparticles for potential application in food industries*, -Journal of Nanoparticle Research, Vol 17, 2015, pp.382.
18. Tuzmen N., Kalburcu T., Denizli A, *α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol 78, 2012, pp. 16– 23.
19. Singh, S., Saikia, J.P., Buragohain, A.K., *A novel reusable PAni-PVA-Amylase film: Activity and analysis*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 106, 2013, pp. 46-50.
20. Bayramoglu, G., Altintas, B., Arica, M.Y., *Immobilization of glucoamylase onto polyaniline-grafted magnetic hydrogel via adsorption and adsorption/cross-linking*, Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (3), 2013, pp. 1149-1159.
21. Madakbaş, S., Daniş, O., Demir, S., Kahraman, M.V., *Xylanase immobilization on functionalized polyaniline support by covalent attachment*, Starch/Staerke, 65 (1-2), 2013, pp. 146-150.
22. Akhond, M., Pashangeh, K., Karbalaeei-Heidari, H.R., Absalan, G., *Efficient immobilization of porcine pancreatic α -Amylase on amino-functionalized magnetite nanoparticles: characterization and stability evaluation of the immobilized enzyme*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 180 (5), 2016, pp. 954-968.
23. Gvozdenović, M.M., Jugović, B.Z., Bezbradica, D.I., Antov, M.G., Knežević-Jugović, Z.D., Grgur, B.N., *Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase*, Food Chemistry, 124 (1), 2011, pp. 396-400.
24. Radovanović M., Jugović B., Gvozdenović M., Jokić B., Grgur B., Bugarski B., Knežević-Jugović Z., *Immobilization of α -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline*. Starch- Stärke, Vol 68, 2016, pp. 427-435.

3. Полазне хипотезе

Основна претпоставка овог рада јесте да ће се везивањем алфа-амилазе за претходно синтетисане и окарактерисане честице носача добити биокатализатор побољшаних својстава у односу на нативну алфа-амилазу. Имобилизацијом алфа-амилазе на полианилину магнетних својстава очекује се лако издвајање биокатализатора из реакционог система и постизање контролисаног мешања кроз реакциони медијум дејством спољашњег магнетног поља.

Приликом израде ове докторске дисертације полази се од следећих претпоставки:

- биокаталитичка својства алфа-амилазе имобилисане на честицама полианилина као и магнетним честицама модификованим полианилином попут активности, pH и температурни профил, стабилност могу се мењати у широком опсегу вредности различитим синтезама и контролисањем параметара у поступку имобилизације ензима;
- претпоставља се позитиван ефекат полианилинске превлаке на имобилизацију алфа-амилазе на магнетне честице са аспекта биокаталитичких својстава и стабилности катализатора;
- једна од полазних хипотеза је да ће се избором методе синтезе као и подешавањем величине, морфологије, дебљине превлаке полианилина и контролом параметара синтезе добити честице одговарајућих магнетних својства што би омогућило олакшану сепарацију биокатализатора из реакционе смеше и тиме вишеструку примену у узастопним шаржама;
- очекује се да ће наведена полимерна превлака допринети и стабилизацији магнетних честица, а да ће добијени имобилизат бити pH и температурно стабилнији од нативне алфа-амилазе;
- важна претпоставка је позитиван утицај честица носача на смањење потребе за додавањем калцијумових соли у реакциону смешу са имобилисаним ензимом услед ефеката расподеле јона калцијума у систему;
- добијени системи са имобилисаном алфа-амилазом на честицама од хематита пресвученим полианилином показује се као погодан биокатализатор у реакцијама хидролизе скроба, како у модел, тако и у реалним системима.

4. Научне методе истраживања

За сва испитивања користиће се алфа-амилаза из *Bacillus licheniformis* (Termamyl, Novozymes, A/S, Данска). Предвиђено је да истраживачки рад буде подељен у неколико фаза.

Током прве фазе истраживања биће синтетисане потребне честице носача за имобилизацију алфа-амилазе. Примениће се хемијска метода синтезе магнетних честица као и честица са полианилинском превлаком и електрохемијска синтеза честица полианилина. У овој фази истраживања извршиће се испитивања структурних, морфолошких и магнетних својстава честица добијених применом две методе синтезе. Морфолошка карактеризација честица вршиће се скенирајућом електронском микроскопијом. Утврдиће се величина честица носача као и морфологија површине магнетних честица са и без полианилинске превлаке. Како би се боље разумела природа потенцијално успостављених веза између ензима и носача, честице носача и имобилизата биће карактерисане Фуријеовом трансформационом инфрацрвеном спектроскопијом.

Методом динамичког расипања светлости испитаће се расподела величине честица и зета потенцијал. Мерење зета потенцијала магнетних честица са и без полианилинске превлаке може указати на потенцијално својство да полимерна превлака стабилизује магнетне честице. Магнетна својства честица и јачина коерцитивног поља испитаће се применом SQUID магнетометрије (суперпроводни квантни интерферометар). Подаци о кристалној структури добиће се рендгенском дифракцијом, што је од велике важности да би се идентификовале кристалне фазе у узорцима честица које су добијене помоћу две различите методе синтезе.

Током друге фазе истраживања биће оптимизовани услови имобилизације алфа-амилазе на синтетисаним честицама носача варирањем времена, почетне концентрације

ензима, рН, температуре, јонске јачине пуфера. Биће испитан утицај величине честица на масу везаног ензима, активност и остала биокаталитичка својства. У току ове фазе истраживања испитаће се термодинамички параметри имобилизације на модификованим и немодификованим магнетним честицама, кинетика адсорпције, а биће предложени и модели адсорпционих изотреми који најбоље описују систем.

Активност слободне и имобилисане алфа-амилазе пратиће се спектрофотометријском методом испитивањем почетних брзина ензимских реакција на основу мерења апсорбанце промене боје скробно-јодног комплекса током времена. У зависности од степена хидролизе скроба вредности апсорбанце ће бити различите, а мерење ће се изводити на 600 nm. За праћење процеса адсорпције мериће се садржај протеина спектрофотометријском методом по Лорију (Lowry) на основу стварања обојених производа ароматичних аминокиселина протеина са Folin-Ciocalten-овим реагенсом у комбинацији са биуретском реакцијом за пептидне везе мерењем апсорбанце на 500 nm. Кинетика реакције са нативним и имобилисаним ензимом ће бити испитана праћењем брзине реакције хидролизе скроба при различитим почетним концентрацијама скроба у почетним условима, док ће кинетички параметри бити одређени на уобичајен начин применом Лајнвивер-Буркове (*Lineweaver-Burk*) методе, Ханес-Вулфове (*Hanes Woolf*) методе и других.

У трећој фази рада испитиваће се стабилност имобилисане алфа-амилазе, могућност употребе кроз више циклуса извођења реакције хидролизе скроба у шаржном реактору са механичким мешањем и потенцијално задржавање активности након одређеног времена чувања.

5. Очекивани научни допринос

Иако су имобилизација ензима на нано/микро магнетним честицама пресвученим различитим полимерним материјалима, као и природа интеракција између ензима и носача предмет актуелних савремених истраживања, веома мало се зна о имобилизацији алфа-амилаза на овим носачима. У неколико радова је показано да хомогено магнетно поље (магнетне индукције 0,15 Т) у одређеном периоду проузрокује повећање активности и стабилности алфа-амилазе имобилисане на хитозанским честицама (вредност Михаелисове константе се смањује, док се вредност максималне брзине повећава). Остала својства попут рН стабилности, термалне стабилности, оперативне стабилности су такође била унапређена, што је објашњено повољним утицајем магнетног поља на конформацију ензима при којој се ензим може чвршће везати за носач. Исто тако, у неким истраживањима је показано да липазе и хитиназе имобилисане на суперпарамагнетним честицама имају повећану активност у обртном магнетном пољу одређене фреквенце, што може да буде од значаја приликом дизајна реактора са овим имобилисаним ензимима. Међутим, у литератури је посвећена веома мала пажња имобилизацији алфа-амилазе на магнетним честицама, док на основу нашег увида, нема података о имобилизацији алфа-амилазе на Fe₂O₃ честицама обложеним полианилином као ни о њиховој примени у реакцији хидролизе скроба.

У истраживањима која се баве овом проблематиком углавном се користе комерцијалне магнетне честице, најчешће набављене од Sigma добављача, док се системи алфа-амилаза имобилисане на Fe₂O₃/полианилину нису разматрали у литератури. Један од циљева овог рада је управо да се утврди корелација између величине и морфологије честица, магнетних својстава, дебљине полианилинске превлаке, што се може мењати у широком распону променом параметара и начина синтезе, и биокаталитичких својстава имобилисане алфа-амилазе.

Од резултата истраживања у овој дисертацији очекује се добијање новог биокатализаторског система са побољшаним особинама у односу на нативну алфа-

амилазу. Конкретно, у оквиру истраживања може се очекивати неколико основних доприноса, и то:

- утврдиће се утицај методе и параметара синтезе честица на кристалну структуру и величину честица, њихова морфолошка и магнетна својства и успоставити корелација између наведених својстава честица и каталитичких својстава биокатализатора;
- утврдиће се кинетика и механизам адсорпције алфа-амилазе на сва четири типа честица, док ће добијени кинетички и термодинамички параметри омогућити поређење система; утврдиће се и капацитет везивања различитих носача;
- добијени резултати могу помоћи бољем разумевању типа веза успостављених између носача и ензима;
- биће дефинисани оптимални параметри имобилизације алфа-амилазе на полианилину и на магнетним честицама са полианилинском превлаком;
- утврдиће се кинетички параметри одабараних имобилисаних система са алфа-амилазом у реакцији хидролизе скроба, као и рН, температурни профил и упоредити са слободним ензимом;
- Испитаће се стабилност имобилисане алфа-амилазе у поновљеним шаржним циклусима и успоставити корелација између величине честица, наелектрисања и магнетних својстава и стабилности биокатализатора;
- утврдиће се оперативна стабилност алфа-амилазе имобилисане на неколико врста честица у условима извођења процеса, односно утврдиће се константа брзине инактивације и време полуживота биокатализатора;
- утврдиће се значај полианилинске превлаке на стабилност магнетних честица и на кинетичка својстава биокатализатора;
- испитаће се почетна кинетика ензимске реакције са имобилисаним ензимом у шаржном реактору са механичким мешањем и реактору где се мешање постиже применом спољашњег магнетног поља и системи ће се упоредити на основу вредности кинетичких параметара;
- утврдиће се утицај магнетног поља на активност биокатализатора, што може да буде од значаја приликом дизајна реактора са овим имобилисаним ензимима.

Резултати истраживања у оквиру ове тезе биће публиковани у више часописа категорије M20 и саопштени на више скупова међународног и националног значаја.

6. План истраживања и структура рада

Истраживања у оквиру ове тезе изводиће се у више фаза током којих ће бити:

1. Синтетисане честице полианилина и магнетних честица са полианилинском превлаком. Извршиће се карактеризација честица носача ради дефинисања морфологије, расподеле величине честица и зета потенцијала.

2. Биће испитани оптимални услови имобилизације алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама пресвученим полианилином варирањем следећих параметара: времена, рН, температуре, почетне концентрације ензима, јонске јачине раствора.

3. Добијени биокатализатори биће окарактерисани што 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.

4. Одредиће се оперативна стабилност алфа-амилазе имобилисане на одабраним честицама у проточном реактору са пакованим слојем а са рецикулацијом смеше

супстрата. Утврдиће се и могућност задржавања активности имобилисаног ензима током чувања.

Предвиђа се да ће у докторској дисертацији бити обрађена следећа поглавља:

У *Уводу* ће бити дефинисани главни циљеви дисертације, предмет истраживања и допринос дисертације.

У *Теоријском делу* биће анализирана претходна истраживања која се односе на примену алфа-амилаза, избор носача за имобилизацију алфа-амилаза, синтезу полианилина и магнетних честица модификованих полианилином. Разматраће се структура алфа-амилазе, нарочито активног центра, са аспекта избора методе за имобилизацију. У овом поглављу ће бити дат осврт на неке од аспеката стабилности алфа-амилазе као резултат њене макромолекулске структуре као и могућности стабилизације ензима имобилизацијом. Како сам процес хидролизе скроба налаже рад на повишеним температурама и то око 100 °C због природе самог супстрата, термичка стабилност алфа-амилазе и његова стабилизација су веома важни за примену овог ензима. У теоријском делу разматрана је и термостабилност алфа амилазе, утицај јона калцијама на термостабилност као и различити кинетички модели који описују инактивацију ензима изазвану топлотом. Биће дат и преглед кинетичких параметара инактивације за овај ензим у различитим имобилисаним системима из литературе.

У *Експерименталном делу* детаљно ће се навести материјал и хемикалије коришћене у раду. Биће описане методе карактеризације носача, методе праћења активности алфа-амилазе, садржаја протеина, методе одређивања кинетичких константи. Тако ће ово поглавље садржати опис:

- материјала коришћених током истраживања у оквиру израде докторске дисертације,
- опреме коришћење за експериментална истраживања,
- техника и метода неопходних за извођење експеримената, метода за испитивања структурних, морфолошких и магнетних својстава честица добијених применом различитих услова синтезе као и метода за одређивање расподеле величине честица и зета потенцијала,
- поступка и оптимизације имобилизације алфа-амилазе на различитим носачима,
- поступка одређивања адсорпционих изотерми као и термодинамичких и кинетичких параметара при адсорпцији ензима,
- метода за одређивање рН и температурног профила имобилисаних алфа-амилаза као и метода за одређивање термичке стабилности;
- метода за испитивање кинетике реакције са имобилисаним ензимима при почетним условима и метода за одређивање кинетичких константи,
- конфигурације шаржног реактора и реактора у коме се мешање честица биокатализатора постиже применом екстерног магнетног поља,
- поступка и оптимизације ензимске хидролизе скроба са одабраним имобилисаним системима у шаржном реактору са механичким мешањем, реактору са пакованим слојем и реактору са мешањем уз помоћ спољашњег магнетног поља.

Поглавље *Резултати и дискусија* садржаће детаљан приказ свих добијених резултата и дискусију. Биће продискутовани резултати везани за синтезу честица носача и њихову карактеризацију. На основу резултата добијених варирањем основних параметара током имобилизације описане се оптимални услови имобилизација алфа-амилазе на синтетисаним носачима. Посебно ће бити дискутовани утицаји појединих параметара на активност добијеног имобилисаног система са упоредним приказом активности алфа-амилазе на појединим носачима. На основу резултата испитивања адсорпције ензима биће предложен модел адсорпционе изотерме. Продискутоваће се резултати

испитивања стабилности имобилисаних система и дати упоредни приказ за имобилизате на различитим носачима.

У *Закључку* ће бити сумирани резултати наведених испитивања јасно и у што краћем облику.

Поглавље *Литература* садржаће наводе цитиране у дисертацији, међу којима и радове проистекле истраживањем у оквиру ове дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног Комисија сматра да је тема докторске дисертације под насловом: „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“, коју је предложила Мирјана Радовановић, дипл.инж., научно заснована и да представља научни 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 Мирјани Радовановић одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. За ментора при изради докторске дисертације предлаже др Зорицу Кнежевић-Југовић, редовног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 10.04.2017. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

Др Милица Гвозденовић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

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

Др Мирјана Антов, редовни професор,
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет