

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета" број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата

КАТАРИНЕ (Миодраг) БАЊАНАЦ, мастер инж. технологије
(име, име једног од родитеља и презиме)

КАНДИДАТ: **КАТАРИНА (Миодраг) БАЊАНАЦ, мастер инж. технологије,**
пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“

Из научне области: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Универзитет је дана **13.06.2016.** године, својим актом **02 број: 61206-2707/2-16** дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

КАТАРИНЕ (Миодраг) БАЊАНАЦ, мастер инж. технологије
(име, име једног од родитеља и презиме)

образована је на седници одржаној **20.04.2017.** године Одлуком Факултета под бр. **35/99,** у саставу:

Име и презиме	Звање	Научна област
1. Др Дејан Безбрадица	Ванредни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
2. Др Александар Маринковић	Доцент	Органска хемија
3. Др Зорица Кнежевић-Југовић	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
4. Др Невена Пралиновић	Научни сарадник	Хемија
5. Др Милица Ранчић	Доцент	Хемија

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **06.07.2017.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

На основу чл. 30. став 3. Закона о високом образовању, чл. 40. Статута ТМФ и чл. 39. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 06.07.2017. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: 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 Универзитета у Београду, Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета, др Милица Ранчић, доцент Универзитета у Београду, Шумарски факултет, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“** коју је поднела **Катарина Бањанац**, мастер инжењер технологије и упућује се на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације Катарине Бањанац, под називом **„Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“** Одлуком 02 број: 61206-2707/2-16 од 13.06.2016. године.

Верификација научних доприноса:

Категорија M21:

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, pp. 439-448, 2016 (**IF= 2.738**) (ISSN 0268-2575).
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*, vol. 91, no. 10, pp. 2654-2663, 2016 (**IF= 2.738**) (ISSN 0268-2575).
3. **Banjanac, K.**, Carević, M., Ćorović, M., Milivojević, A., Prlainović, N., Marinković, A., Bezbradica, D.: Novel β -galactosidase nanobiocatalyst systems for application in the synthesis of bioactive galactosides, - *RSC Advances*, vol. 6, no.1, pp. 97216–97225, 2016 (**IF=3.840**) (ISSN 2046-2069).

Докторска дисертација и реферат о оцени докторске дисертације достављају се на увид јавности, а по истеку рока од 30 дана, на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду.

Одлуку доставити: Већу научних области техничких наука Универзитета, ментору, Служби за наставно-студентске послове, Библиотеци и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Катарине Бањанац

Одлуком Научно-наставног већа Технолошко-металуршког факултета бр. 35/99 од 20.04.2017. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Катарине Бањанац под насловом

Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

- **Школске 2013/14 године** кандидат Катарина Бањанац, мастер имж. технологије уписала је Докторске академске студије на Универзитету у Београду, Технолошко-металуршки факултет, профил Биохемијско инжењерство и биотехнологија.
- **01.04.2016.** кандидат Катарина Бањанац, мастер инж. технологије је предложила тему докторске дисертације под називом „Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“.
- **14.04.2016.** на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду донета је одлука (бр. 35/166) о именовању чланова Комисије за оцену научне заснованости теме и подобности кандидата Катарине Бањанац, мастер инж. под насловом „Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“.
- **26.05.2016.** на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду донета је одлука о прихватању теме докторске дисертације под називом „Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“, а за менторе су именовани Др Дејан Безбрадица и Др Александар Маринковић (Одлука бр.35/257).
- **13.06.2016.** Веће научних области техничких наука доноси одлуку по којој даје сагласност на предлог теме „Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима“ кандидата Катарине Бањанац, мастер инж. (Одлука бр. 61206-2707/2-16).
- **20.04.2017.** на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду донета је одлука о именовању чланова Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Катарине Бањанац, мастер инж. под називом

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство и ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. Ментори су Др Дејан Безбрадица, ванредни професор ТМФ-а, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија и Др Александар Маринковић, доцент ТМФ-а, ужа научна област Хемијско инжењерство, који су на основу претходно објављених научних радова и научноистраживачког искуства компетентни да руководе изработом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Кандидат Катарина Бањанац, мастер инжењер технологије, 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 и 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, под менторством др Дејана Безбрадице, уписала је школске 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. Катарина Бањанац изабрана је у звање истраживач сарадник у јуну 2015. године на Технолошко-металуршком факултету. Од 1.03.2017. године Катарина Бањанац је као истраживач сарадник запослена на пројекту "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности" ев. бр. ИИИ 46010, који финансира Министарство науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије. Коаутор је девет радова у часописима међународног значаја (шест M21, по један M22, M23 и M24), два рада у часописима националног значаја (по један M51 и M52) и седам саопштења на домаћим и међународним скуповима (два M33, четири M34 и један M63).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Катарине Бањанац написана је на 242 стране, са укупно 6 поглавља, 117 слика, 27 табела и 273 литературна навода. Докторска дисертација састоји се из следећих поглавља: Увод, Теоријски део, Материјали и методе, Резултати и дискусија, Закључак и Литература, уз изводе на српском и енглеском језику.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације описан је значај примене SiO₂ наночестица и мотиви за њихову хемијску модификацију реакцијом силанизације са посебним освртом на примену модификованих честица као носача за имобилизацију индустријски важних ензима. Представљен је план истраживања са посебним нагласком на методе модификације које ће

бити примењене и разлоге за њихову примену у припреми нових имобилисаних ензимских препарата важних индустријских ензима (липаза, β -галактозидаза и протеаза) са циљем повећане каталитичке активности, оперативне и термичке стабилности и измењене селективности у односу на постојеће препарате.

У **Теоријском делу** је указано на значај имобилизације ензима, дефинисане су методе које се примењују за имобилизацију ензима, као и најважније особине имобилисаних ензима. Имобилизација ензима на различите типове наноматеријала је обрађена у посебном поглављу, у оквиру којег су истакнуте предности и мане употребе носача нано-димензија за имобилизацију ензима, као и утицај структуре ових носача на активност и стабилност имобилисаних ензима. Пошто су у склопу ове докторске дисертације коришћене наночестице силике описани су индустријски поступци синтезе ових наночестица и утицај поступка на основне физичке и хемијске особине индустријски синтетисаних наночестица силике, као и методе карактеризације ових честица. Представљене су и методе које су коришћене за модификацију површине наночестица силике, са посебним освртом на примену немодификованих и хемијски модификованих наночестица силике као носача за имобилизацију ензима адсорпцијом и или ковалентном имобилизацијом.

У поглављу **Материјали и Методе** наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, а затим су наведене методе коришћене у току експерименталног рада и обраде резултата. Прво су описани услови и методе модификације наночестица силике реакцијом силанизације. Потом су описане процедуре за одређивање концентрације уведених функционалних група на површину наночестица силике реакцијом силанизације. Описане су и процедуре карактеризације добијених модификованих наночестица силике применом TGA и FTIR спектроскопије. Описане су методе имобилизације ензима (липазе, β -галактозидазе и протеаза) како на немодификоване тако и на модификоване наночестице силике. Такође, описане су процедуре коришћене за квантитативну анализу ензимске активности, као и концентрације протеина у добијеним имобилисаним ензимским препаратима. Затим су описани поступци одређивања термичке и оперативне стабилности добијених имобилисаних препарата. Наведени су услови под којима је утврђивана применљивост одабраних имобилисаних ензима у реакцијама естерификације (синтеза амил-капроата и аскорбил-олеата), трансгалактозилације (синтезе галакто-олигосахарида из лактозе и галактозида галактитола из лактозе и галактитола) и хидролизе протеинског изолат сунцокрете сачме. Описана је и метода раздвајања и квантификовања добијених производа трансгалактозилације применом течне хроматографије високих перформанси са рефрактометријским детектором и колоном за раздвајање шећера. Описана је и електрофоретска метода раздвајања и детекције ензима присутних у комерцијалном препарату протеаза (Flavourzyme) као и у супернатантима одвојеним након завршене имобилизације.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду при изради ове дисертације, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са резултатима добијених у радовима из литературе у сличним испитаним системима. Резултати и дискусија састоје се из четири поглавља: Хемијска функционализација наночестица силике, Имобилизација липазе на функционализоване наночестице силике, Имобилизација β -галактозидазе из *A. oryzae* на функционализоване наночестице силике и Имобилизација протеаза на функционализоване наночестице силике.

У **првом поглављу** оптимизована је хемијска модификација непорозне пирогене наносилике (Aerosil 380, Evonik Industries, Essen, Немачка) (FNS) ради њене примене као носача за имобилизацију ензима са идејом да се добију имобилисани ензими повећане активности и стабилности. Примењене су методе хемијске модификације (реакцијом силанизације) ради увођења нових функционалних група на површину SiO_2 наночестица. Као модификујући реагенси су коришћени органосилани, и то 3-(аминопропил)триметоксисилан, триметокси(2-фенилпропил)силан и (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан. 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

результат има увођење терминалних амино, фениламино и епокси функционалних група на површину наночестица. Процес модификације је оптимизован из аспекта постигнуте концентрације амино група и епоксидних (оксиранских) група на површини наночестица у зависности од дужине трајања третмана и коришћеног масеног односа наночестица и одговарајућег силана. Наночестице силике модификоване амино-органосиланом су потом третиране активирајућим реагенсом цијанурил-хлоридом. Поступак активације цијанурил-хлоридом је оптимизован праћењем утицаја концентрације цијанурил-хлорида, температуре и дужине третмана на активност добијених имобилисаних ензима. Све добијене модификоване наночестице силике су анализиране FTIR и TGA спектроскопијом ради проучавања структуралних промена SiO₂ наночестица изазваних модификацијом.

У **другом поглављу** оптимизована је имобилизација липазе продуцента *C. rugosa* на немодификоване (FNS), амино-модификоване (AFNS), цијанурил-хлоридом активирани амино-модификоване (CCAFNS) и епокси-модификоване (GFNS) наночестице силике. Праћена је кинетика имобилизације (одређивањем концентрације имобилисаних 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. Ови резултати су искоришћени и за постављање хипотеза о механизму имобилизације липазе на наночестице силике. Након завршене оптимизације имобилизације липазе одређивана је и упоређена и термичка и оперативна стабилност добијених имобилисаних препарата липазе. Иmobилисане липазе најбољих карактеристика примењене су потом у реакцији синтезе амил-капроата. Такође, на основу претходно оптимизованих услова за имобилизацију липазе из *C. rugosa* извршена је и имобилизација липазе типа В продуцента *Candida antartica* на FNS, CCAFNS и GFNS наночестице. Одабрани имобилисани препарати CAL В су примењени у реакцији синтезе аскорбил-олеата, вредног физиолошки активног естра витамина Ц.

У **трећем поглављу** оптимизована је имобилизација β -галактозидазе из *A. oryzae* на FNS, AFNS и CCAFNS наночестице силике. Оптимизација имобилизације β -галактозидазе се састојала у праћењу утицаја концентрације понуђених протеина на кинетику везивања β -галактозидазе. Ефикасност имобилизације је праћена на основу концентрације имобилисаних протеина и концентрација имобилисане активности, а утврђен је и дискутован механизам имобилизације β -галактозидазе на AFNS наночестице које су се показале најпогоднијим носачем за ову врсту имобилизације. Анализиран је и утицај рН коришћеног пуфера за имобилизацију на активност имобилисане β -галактозидазе на AFNS наночестице. За одабране имобилисане препарате утврђена је термичка стабилност на 60 °С. Иmobилисана β -галактозидаза добијена под оптималним условима је примењена у реакцијама синтезе галакто-олигосахарида и галактозида галактитола.

У **четвртном поглављу** оптимизована је имобилизација комерцијалних препарата протеаза Flavourzyme и Alcalase на FNS, AFNS, CCAFNS и GFNS наночестице силике. С обзиром да комерцијални препарат протеаза Flavourzyme представља смешу више ензима са ендо- и егзо-пептидазном активношћу, концентрација имобилисане активности је праћена применом две методе како би се детектовала обе врсте ензимске активности. Такође, овај комерцијални препарат је раздвојен електрофоретском анализом, а иста техника је коришћена за праћење евентуалних разлика у афинитету појединачних протеина који чине овај препарат за везивање на наночестице. Одабрани имобилисани препарати Flavourzyme-а и Alcalase су примењени у реакцији хидролизе протеинског изолата сунцокретовете сачме.

У поглављу **Закључци** су изнети закључци изведени на основу резултата представљених у претходним поглављима који су у сагласности са постављеним циљевима рада.

На крају дисертације дат је списак коришћене литературе.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

У досадашњој пракси за имобилизацију ензима употребљавани су различити конвенционални носачи чији су бар неколико стотина микрометара, али последњих година све више се као носачи за имобилизацију ензима користе природни или синтетски наноматеријали. Показало се да примена наноматеријала омогућава добијање имобилисаних ензима веће активности, модификоване селективности и значајно повећане стабилности у поређењу са ензимима имобилисаним на конвенционалне носаче јер поседују карактеристике које их чине погодним носачима за имобилизацију ензима као што су велика специфична површина по јединици масе, минимална дифузиона ограничења и могућност хемијске модификације површине. Управо је једноставност хемијске модификације површине наночестица важан предуслов за ширу примену ових носача јер ефикасност имобилизације ензима зависи како од расподеле бочних аминокиселинских остатака на површини ензима, тако и од типа и 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. Стога се контролисана и оптимизована примена хемијских модификација површине користи за добијање носача са оптималном концентрацијом жељених реактивних функционалних група, а често модификацијом може бити промењена хидрофилност површине што такође може позитивно да утиче на активност и стабилност имобилисаних ензима.

Из свих наведених разлога у овој дисертацији је непорозна пирогена наносилика (Aerosil 380, Evonik Industries, Essen, Немачка) хемијски модификована ради примене као носача за имобилизацију индустријских ензима са мотивом да се добију имобилисани ензими повећане активности и стабилности. Непорозне пирогене наночестице силике су биокомпатибилне и нетоксичне што је допринело одлуци да буду коришћене као полазни материјал за дизајн нових носача који би били примењени у имобилизацији ензима. У првој фази хемијске модификације примењена је реакција силанизације ради увођења нових функционалних група на површину SiO_2 наночестица. Разлог за примену ове реакције је чињеница да честице имају силанолне групе ($-\text{SiOH}$) на својој површини па се одигравањем хемијске реакције између силанолних група на површини наночестица и метокси или етокси група органосилана, које су подложне хидролизи, долази до стварања $-\text{Si-O-Si}-$ мостова. У овом раду су као модификујући агенси коришћена три органосилана (3-(аминопропил)триметоксисилан, триметокси(2-фенилпропил)силан и (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан) па су добијени деривати са терминалном amino, фениламино или оксиранском функционалном групом на површини наночестица. Ипак, деривати који омогућују само имобилизацију адсорпцијом су додатно модификовани пошто је један од кључних параметара ефикасности имобилизације ензима стабилност добијеног имобилисаног ензима, а ковалентно имобилисани ензими у највећем броју случајева показују побољшану стабилност у односу на ензиме везане адсорпцијом. Из тог разлога су наночестице силике модификоване amino-органосиланом активираним цијанурил-хлоридом док наночестице силике модификоване (3-глицидилоксипропил)триметоксисиланом нису модификоване јер је могућа ковалентна имобилизација ензима преко оксиранских група. Ово је први пут да се овакве модификоване наночестице силике користе као носачи за имобилизацију индустријски важних ензима (липазе, β -галактозидазе и протеазе). Након оптимизације имобилизације ензима на модификоване наночестице силике испитане су оперативна (могућност употребе у више реакционих циклуса) и термичка стабилност ензима имобилисаних на немодификоване и модификоване SiO_2 наночестице како би се утврдило да ли примењене наночестице имају потенцијал за примену у имобилизацији ензима.

Модификоване наночестице силике су примењене у имобилизацији три ензима (липаза, β -галактозидаза и протеаза) због великог значаја ових ензима у савременим индустријским ензимским процесима, али и стицања увида у примењивост носача у имобилизацији ензима који се значајно разликују у хемијском саставу површине и условима примене. Липазе су од великог значаја јер се последњих година све више пажње посвећује ензимској синтези физиолошки активних естара пошто овако синтетисана једињења имају статус природних производа. У овој дисертацији су одабрани препарати имобилисане липазе коришћени у реакцији синтезе арома естара и естара витамина Ц који се користе у прехранбеној индустрији. β -Галактозидаза је ензим са примарном биолошком функцијом катализовања хидролизе лактозе, али су новија истраживања углавном усмерена ка искоришћењу њене трансгалактозилационе активности. Зато су у овој дисертацији имобилисане β -галактозидазе коришћене у реакцији синтезе биоактивних галактозида чији је пребиотички потенцијал доказан и има веома значајан позитиван утицај на људско здравље. Добијене имобилисане протеазе су коришћене у реакцији хидролизе протеинског изолата сунцокретовете сачме која се изводи са циљем добијања протеинских хидролизата високих нутритивних вредности.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитирано је 273 литературних навода који су омогућили да се представи стање у испитиваној научној области и да се сагледа актуелност проблематике. Савремена истраживања публикована у реномираним научним часописима су приказана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су дали добар увид у могућност примене немодификованих и хемијски модификованих наночестица силике као носача за имобилизацију ензима. Овако направљен преглед и анализа актуелне литературне периодике послужио је као основ за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Преглед литературе која је употребљавана у току истраживања, образложење предложене теме дисертације и објављени радови кандидата наведени у пријави, указују на адекватно познавање области истраживања и актуелног стања истраживања у овој конкретној области.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати приказани у овој докторској дисертацији су доказани применом адекватних експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим процедурама из литературе, као и одговарајућом анализом и обрадом података.

Структурна карактеризација наночестица силике које су примењиване као носачи приликом имобилизације ензима (липаза, β -галактозидаза и протеаза) вршена је коришћењем TGA (Thermogravimetric analysis) и FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) спектроскопије. Концентрација amino и епокси група, уведених приликом модификовања носача, одређивана је коришћењем метода титрације помоћу NaOH и HBr/CH₃COOH.

Имобилизација липаза, β -галактозидаза и протеаза на различите наночестице је извршена применом метода претходно описаних у релевантним литературним изворима, као и применом оригиналних процедура оптимизованих у оквиру овог експерименталног рада.

За анализу добијених имобилисаних ензимских препарата примењене су стандардне спектрофотометријске методе: за одређивање активности липаза праћена је реакција хидролизе *p*-нитрофенил палмитата (*p*-NPP) и бутирата (*p*-NPB), за одређивање активности β -галактозидаза хидролиза *o*-нитрофенил- β -D-галактозида (*o*-NPG), а за одређивање активности протеаза хидролиза азоказеина и L-леуцин-*p*-нитроанилида. За одређивање концентрације имобилисаних протеина коришћене су методе по Бредфорду (Bradford) и Лорију (Lowry).

Липаза продуцента *C. rugosa* коришћена је у синтези амил-капроата, при чему је принос производа одређиван титрацијом помоћу NaOH. Естерификациона активност липазе из квасца *C. antarctica* праћена је у реакцији добијања аскорбил-олеата. Квантитативне анализе вршене су применом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC). Коришћена је хидрофобна колона (Hypersil gold C 18, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm) као стационарна фаза, а као мобилна фаза коришћен је 100 % метанол са константним протоком од 1 ml/min на 40 °C.

Производи реакције трансгалактозилације (галакто-олигосахариди и галактозиди галактитола) катализоване одабраним имобилисаним препаратом β-галактозидазе раздвојени су и квантификовани течном хроматографијом високих перформанси опремљеном аналитичком колоном за шећере (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺, 300 × 7,7 mm, 8μm) на 80 °C. Као мобилна фаза коришћена је вода са константним протоком 0,6 ml/min. Детекција производа вршена је помоћу рефрактометријског детектора (RID).

Принос производа у реакцији хидролизе протеинског изолата сунцокрете сачме катализованом имобилисаним протеазама је одређиван применом нинхидринске реакције, док су производи реакције раздвојени и квантификовани течном хроматографијом високих перформанси опремљеном аналитичком хидрофобном колоном (Hypersil gold C18, 150 mm × 4,6 mm, 5μm). Детекција производа вршена је UV детектором на 210 nm. Коришћен је градијентни систем са две мобилне фазе: водени раствор 0,1 М трифлуорсирћетне киселине (мобилна фаза А) и ацетонитрил (мобилна фаза Б).

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа литературних података и експерименталних резултата приказаних у оквиру ове дисертације, може се закључити да је остварен значајан допринос у примени наночестица силике као носача за имобилизацију ензима. Установљено је да припрема оптималног носача на бази наносилике хемијским модификацијама за имобилизацију ензима мора бити циљан и специфичан процес који зависи од карактеристика ензима, првенствено распореда аминокиселинских остатака на његовој површини. У имобилизацији липаза највеће активности и стабилности имобилисаних ензима су постигнуте са носачима који омогућују формирање ковалентне везе (CCAFNS и GFNS), а добијени имобилисани ензими су показали високу естерификациону активност у синтези арома естра и биоактивних естара витамина Ц. Утврђено је да се хемијском модификацијом примена наносилике у имобилизацији липаза може додатно унапредити третманом фениламино-органосиланима који повећавају хидрофобност површине носача што представља погоднију микрооколину за дејство липаза. При имобилизацији две индустријски значајне протеазе опет су погодне биле ковалентне методе имобилизације, а показано је да добијени имобилисани препарати могу да се примене у хидролизи протеинског изолата сунцокрете сачме са циљем добијања хране за људе и животиње повећане дигестивности. С друге стране, због специфичности распореда аминокиселинских остатака на површини ензима, за имобилизацију β-галактозидазе најпогоднијим се показао аминокиселински модификовани носач на који се ензим имобилише адсорпцијом. Од великог значаја за примену овог имобилисаног ензима је чињеница да се имобилизацијом повећала трансгалактозилациона активност у односу на хидролитичку, па је у дисертацији показано да је овакав имобилисани препарат погодан за употребу и синтези биоактивних пребиотика, галакто-олигосахарида.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Катарина Бањанац је мастер инжењер технологије. Током израде докторске дисертације испољила је изузетну стручност у реализацији експеримената и коришћењу различитих техника и метода, а при анализи резултата је показала самосталност, систематичност и креативност. Кандидат има изузетну склоност ка експерименталном раду и

инжењерски приступ у развоју и реализацији експерименталних техника. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

- Оптимизацијом реакције модификације површине непорозних пирогених наночестица силике (FNS) амино-органосиланом (APTMS-ом) установљено је да се при масеном односу FNS:APTMS=1:1 на 25 °C током 48 h и у инертној атмосфери добија највећа концентрација амино група (4,58 $\mu\text{mol/mg}$) на површини амино-модификованих наночестица силике (AFNS) па су ови деривати коришћени у имобилизацији ензима или даљој модификацији.
- Оптимални услови за реакцију активације цијанурил-хлоридом (CC) амино-модификованих наночестица силике (AFNS) су: масени однос AFNS:CC 1:5, време 1 h и температура 0 ° C.
- Оптимизацијом модификације површине наночестица силике епокси-органосиланом добијено је да су оптимални услови реакције модификације 1 h на 25 °C у инертној атмосфери. Варирањем концентрације употребљеног епокси-органосилана за модификацију наночестица силике утврђено је да се највеће концентрације имобилисане активности липазе из *C. rugosa* добијају када се концентрације уведених епокси група на површину епокси-модификованих наночестица силике (GFNS) крећу у опсегу од 440 до 520 $\mu\text{mol/g}$.
- Избор типа хемијске модификације наносилике за примену у имобилизацији директно зависи од врсте ензима:
 - У имобилизацији липаза је утврђено да се најефикаснија имобилизација одиграва формирањем ковалентних веза између ензима и хлоридних, односно епокси група присутних на површини CCAFNS и GFNS наночестица.
 - У имобилизацији β -галактозидазе примећен је другачији тренд па се имобилисани ензим највеће активности добија формирањем привлачних електростатичких интеракција између негативно наелектрисаних карбоксилних група присутних на површини молекула ензима и позитивно наелектрисаних амино група присутних на површини AFNS наночестица.
 - У имобилизацији протеаза опет је примећено да су погодни носачи који омогућују формирање ковалентних веза са ензимом. Имобилисана алкалаза највеће активности је добијена формирањем ковалентних веза између молекула ензима и епокси група GFNS наночестица у 1 M пуферу. С друге стране, ензимима који чине комерцијални препарат Flavourzyme највише за везивање у контексту имобилисане активности одговарају CCAFNS наночестице.
- Одабрани препарати имобилисане липазе су примењени у синтези естара. Установљено је да врста примењене модификације наночестица силике утиче на афинитет имобилисане липазе према естерификацији, с обзиром да је липаза имобилисана на GFNS дериват показала два пута већу активност у реакцији естерификације у односу на CCAFNS дериват. Додатно повећање естерификационе активности липазе Б продуцента *C. antarctica* (CAL B) у реакцији синтезе аскорбил-олеата постигнуто је приликом имобилизације на фениламино-модификоване наночестице (PAPMS-FNS). Најмању естерификациону активност је имала липаза имобилисана на немодификоване FNS наночестице пошто реакцији синтезе аскорбил-олеата пуно више одговарају ензими имобилисани на хидрофобне носаче.

- Приликом примене имобилисане β -галактозидазе у реакцији синтезе биоактивних галактозида (галакто-олигосахарида (GOS) и галактозида-галактитола) констатовано је да ензим имобилисан на AFNS наночестице има бољи афинитет ка синтези галактозида у односу на слободан ензим. Такође, овај ензим је показао веће проценте конверзије лактозе што је веома битно са економске тачке гледишта, јер се олакшава сепарација производа.
- Коришћењем имобилисане алкалазе на GFNS наночестице и имобилисаног Flavourzyme-a-a на CCAFNS наночестице у реакцији хидролизе протеинског изолат сунцокретовете сачме утврђено је да се најинтензивнија хидролиза протеинског изолат одиграва приликом сукцесивне употребе оба препарата, када се прво испољи ендопептидазна активност имобилисане алкалаза.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне научне литературе која описује имобилизацију ензима на конвенционалне носаче и носаче нано-димензија, као и разматрањем резултата проистеклих из истраживања у оквиру ове докторске дисертације може се закључити да добијени имобилисани ензими у потпуности задовољавају неопходне услове за примену на индустријском нивоу. Примењена имобилизациона техника и претходна хемијска модификација површине наночестица силике довела је до значајног повећања активности, термичке и оперативне стабилности имобилисаних ензима и њихових афинитета према реакцији естерификације, трансгалактозилације и хидролизе што омогућује постизање већих приноса производа који се могу применити као компоненте хране за људе и животиње или козметичких препарата.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Катарина Бањанац је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштењима на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су до сада у оквиру три рада у научним часописима међународног значаја (M21). Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још шест радова у часописима међународног значаја, два рада у часописима националног значаја и седам саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

Категорија M21:

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, pp. 439-448, 2016 (**IF= 2.738**) (ISSN 0268-2575).
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*, vol. 91, no. 10, pp. 2654-2663, 2016 (**IF= 2.738**) (ISSN 0268-2575).
3. **Banjanac, K.**, Carević, M., Ćorović, M., Milivojević, A., Prlainović, N., Marinković, A., Bezbradica, D.: Novel β -galactosidase nanobiocatalyst systems for application in the

synthesis of bioactive galactosides, -*RSC Advances*, vol. 6, no.1, pp. 97216–97225, 2016 (IF=3.840) (ISSN 2046-2069).

Kategorija M34:

1. Prlainović, N., Stojanović, M., Carević, M., Mihailović, M., **Banjanac, K.**, Marinković, A., Bezbradica, D.: Two-step modification of silica nanoparticles for covalent lipase immobilization, -*8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, pp. 1 (ISBN 978-86-7132-053-5).
2. Lukić, N., Jakovljević, A., Carević, M., **Banjanac, K.**, Bezbradica, D.: Developement of nanobiocatalyst systems for application in biosynthesis of functionally active galactoside, -*Fifteenth Young Researchers Conference- Materials Science and Engineering*, 2016, Beograd, pp. 35 (ISBN 978-86-80321-32-5).

Остали научни радови кандидата

Kategorija M21:

1. Carević, M., Bezbradica, D., **Banjanac, K.**, Milivojević, A., Fanuel, M., Rogniaux, H., Ropartz, D., Velicković, D.: Structural elucidation of enzymatically synthesized galactooligosaccharides using ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry, -*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, no. 18, pp. 3609-3615, 2016 (IF=2,912) (ISSN 0021-8561).
2. Carević, M., Ćorović, M., Mihailović, M., **Banjanac, K.**, Milisavljević, A., Veličković, D., Bezbradica, D.: Galacto-oligosaccharide synthesis using chemicaly modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilized onto macroporous amino resin, -*International Dairy Journal*, vol. 54, no. 1, pp. 50-57, 2016 (IF=2,008) (ISSN 0958-6946).
3. Mihailović, M., Stojanović, M., **Banjanac, K.**, Carević, M., Prlainović, N., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite A109 and its post-immobilization stabilization, -*Process Biochemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 637-646, 2014 (IF=2.529) (ISSN 1359-5113).

Kategorija M22:

1. Ćorović, M., Mihailović, M., **Banjanac, K.**, Carević, M., Milivojević, A., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto Purolite[®] MN102 and its application in solvent-free and organic media esterification, -*Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 40, no. 1, pp. 23-34, 2017 (IF=1.997) (ISSN 1615-7591).

Kategorija M23:

1. Mihailović, M., Trbojević-Ivić, J., **Banjanac, K.**, Milosavić, N., Veličković, D., Carević, M., Bezbradica, D.: Immobilization of maltase from *Saccharomyces cerevisiae* on thiosulfonate supports, -*Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 81, no. 12, pp. 1371-1382, 2016 (IF= 0.970) (ISSN 0352-5139).

Kategorija M24:

1. Carević, M., **Banjanac, K.**, Ćorović, M., Jakovetić, S., Milivojević, A., Vukašinović-Sekulić, M., Bezbradica, D.: Selection of lactic acid bacteria strain for simultaneous production of α - and β -galactosidases, -*Zaštita materijala*, vol. 57, no. 2, pp. 265-273, 2016 (IF= 0.688) (ISSN 0351-9465).

Kareriopija M33:

1. Carević, M., **Banjanac, K.**, Lukić, N., Jakovljević, A., Ćorović, M., Milisavljević, A., Bezbradica, D.: Synthesis of galactitol galactoside using transgalactosylation activity of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, -*III International congress of Food Technology, Quality and Safety*, 2016, Novi Sad, pp. 100 (ISBN 978-86-7994-049-0)
2. Ćorović, M., **Banjanac, K.**, Prlainović, N., Milisavljević, A., Carević, M., Marinković, A., Bezbradica, D.: Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto modified silica nanoparticles and its application for the synthesis of l-ascorbyl oleate, -*III International congress of Food Technology, Quality and Safety*, 2016, Novi Sad, pp. 101 (ISBN 978-86-7994-049-0).

Kategorija M34:

1. Mihailović, M., Carević, M., Stojanović, M., Prlainović, N., **Banjanac, K.**, Bezbradica, D.: Chemical modification of Purolite A109 for application in lipase immobilization, -*8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, pp. 34 (ISBN 978-86-7132-053-5).
2. Carević, M., **Banjanac, K.**, Ćorović, M., Milivojević, A., Prlainović, N., Marinković, A., Bezbradica, D.: Sorbitol Galactoside Synthesis using β -Galactosidase immobilized on functionalized silica nanoparticles, - *19th International Conference on Biotechnology, Bioengineering and Nanoengineering*, 2017, Lisbon, pp. 77 (2010-3778).

Kategorija M51:

1. Carević, M., Vukašinović-Sekulić, M., **Banjanac, K.**, Milivojević, A., Ćorović, M., Bezbradica, D.: Characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus*: stability and kinetic study, - *Advanced Technologies*, vol. 6, in press, 2017 (ISSN 2406-2979)

Kategorija M52:

1. Carević, M., Ćorović, M., **Banjanac, K.**, Milivojević, A., Bezbradica, D.: Optimization of galacto-oligosaccharides synthesis using response surface methodology, - *Food and Feed research*, vol. 44, in press, 2017 (ISSN 2217-5369)

Kategorija M63:

1. Mihailović, M., **Banjanac, K.**, Stojanović, M., Prlainović, N., Jakovetić, S., Carević, M.: Stabilizacija imobilisane lipaze iz *Candida rugosa* tretmanom imobilizata aminokiselinama,

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Катарине Бањанац, мастер инж. технологије под називом „**Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима**” сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима и на међународним конференцијама. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да се докторска дисертација под називом „**Имобилизација ензима на наночестице SiO₂ модификоване органосиланима**“ кандидата Катарине Бањанац прихвати, изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

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

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

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

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