

**ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ**

35/260
(Број захтева)
10.08.2018.
(датум)

**Образац 2
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ
НАУКА**

(назив већа научне области коме се захтев упућује)

Београд, Студентски трг бр. 1

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета у Београду” број 162/11, пречишћен текст, 167/12, 172/13 и 178/14), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата:

МИРЈАНЕ (Новак) РАДОВАНОВИЋ, дипломираног инжењера технологије

КАНДИДАТ: **МИРЈАНА (Новак) РАДОВАНОВИЋ** пријавила је докторску дисертацију под називом:

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

Из научне области: **ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО**

Универзитет је дана **05.06.2017.** године, својим актом **61206-1882/2-17**, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

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

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **МИРЈАНЕ (Новак) РАДОВАНОВИЋ**, образована је на седници Наставно-научног већа одржаној **31.05.2018.** године Одлуком Факултета под бр. **35/197**, у саставу:

Име и презиме	Звање	Научна област
1. Др Зорица Кнежевић-Југовић	Редовни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
2. Др Милица Гвозденовић	Ванредни професор	Електрохемија
3. Др Дејан Безбрадица	Ванредни професор	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
4. Др Мирјана Антов	Редовни професор	Хемијско инжењерство

Студен је уписан на докторске студије шк. **2008/2009.** године. 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.

Шк. 2016/2007. године важи продужење одобрено за шк. 2015/2016. годину које, због мировања годне, није искоришћено.

На захтев студента и уз предлог ментора Наставно-научно веће је на седници одржаној 21.09.2017. године донело Решење број 35/359 којим му је одобрено продужење рока за завршетак студија и за још два семестра школске 2017/2018. године.

Наставно-научно веће Факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној дана **06.07.2018.** године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 104. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 40. Статута ТМФ-а и чл. 39. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 06.07.2018. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Милица Гвозденовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Дејан Безбрадица, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Мирјана Антов, редовни професор Универзитета у Новом Саду, Технолошки факултет, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације под називом: **„Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“** коју је поднела **Мирјана Радовановић**, дипломирани 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 Мирјане Радовановић, под називом **„Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“** Одлуком број: 61206-1882/2-17 од 05.06.2017. године.

Верификација научних доприноса:

Категорија M22:

1. **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, pp. 427–435, 2016. (IF 1,523) (ISSN 1521-379X)

Категорија M23:

1. **Radovanović M.**, Nikolić M, Đurović V., Jugović B., Gvozdenović M., Grgur B., Knežević-Jugović Z.: *Stabilizacija magnetnih čestica polianilinom i imobilizacija alfa-amilaze*, -Hemijska industrija, 72(1), pp. 1-12, (IF=0,459) (DOI: 10.2298/HEMIND161213016R).

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 у Београду, ментору, Служби за наставно-студентске послове, Библиотеци и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Мирјане Н. Радовановић, дипл.инж. технологије

Одлуком бр. 35/197 од 31.05.2018. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Мирјане Н. Радовановић под насловом

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

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

16.12.2016. - Кандидат Мирјана Н. Радовановић, дипл.инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“

29.12.2017. - Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду одлуком бр. 35/653 усвојило је Комисију за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације и научне заснованости теме.

20.04.2017. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, на основу поднетог извештаја Комисије, закључено је да је тема подобра за израду докторске дисертације и 21.04.2017. поднет је Захтев бр.35/89 Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације Мирјане Н. Радовановић, дипл. инж. технологије под називом: „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“

05.06.2017. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Мирјане Н. Радовановић, дипл.инж. технологије под називом: „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“

31.05.2018. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је Одлука бр. 35/197 о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Мирјане Н. Радовановић, дипл. инж. технологије под називом: „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“.

Кандидат је уписао докторске студије 28.10.2008. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Зорица Кнежевић-Југовић, професор Технолошко-металуршког факултета). На захтев студента на основу поднетих докумената, декан је донео Решење бр. 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-научног већа је на седници одржаној 22.10.2015. донето Решење бр. 35/516 којим је одобрен продужетак рока за завршетак студија за два семестра школске 2015/2016. године.

На захтев студента, а на основу поднетих докумената, декан је донео Решење бр. 05-10/45 од 27.10.2015. године којим је одобрено мировање права и обавеза у школској 2015/2016. години због неге другог детета до годину дана.

На захтев студента и уз сагласност ментора декан је донео Решење бр. 20/129 од 06.10.2016. којим се одобрава продужење рока за завршетак студија за два семестра школске 2016/2017. године због мировања права и обавеза у школској 2015/2016. години.

На захтев студента и уз сагласност ментора Наставно-научно веће је на седници одржаној 21.09.2017. донело Решење бр. 35/359 којим је одобрен продужетак рока за завршетак студија за два семестра школске 2017/2018. године.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања изведена у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство (ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија) за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За ментора је изабрана др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета који је на основу публикација у релевантним научним часописима и истраживачког искуства у овој области компетентна да руководи израдом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Мирјана Н. Радовановић рођена је 14. јула 1984. године у Ивањици где је завршила основну школу и гимназију 2003. године. 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 рад са просечном оценом 9,73. Током рада на докторској тези боравила је две године на породилском одсуству.

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 запослена на Агрономском факултету у Чачку Универзитета у Крагујевцу у звању асистента.

Током досадашњег истраживачког рада ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, број ИИИ 46010 под називом: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компоненти у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (2011-2018).

Из резултата досадашњег научно-истраживачког рада кандидата произашла су 3 (три) рада објављена у часописима међународног значаја (М20: 1 рад М22, 2 рада М23), 1 рад објављен у зборнику скупа међународног значаја штампан у целини (1 рад М33), 2 рада са међународног скупа штампана у изводу (2 рада М34), 6 радова објављених у зборницима скупова националног значаја (6 радова М63).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Мирјане Н. Радовановић написана је на 112 страна, са укупно 6 поглавља, садржи 51 дијаграма, 5 табела и 145 литературних навода. Докторска дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак, Литературу и Прилоге, уз изводе на српском и енглеском језику.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације дефинисан је главни циљ дисертације, предмет истраживања и допринос дисертације. Указано је на светски тренд замене класичне киселинске хидролизе скроба ензимском због добијања чистијих производа, мање обојених, уз мањи утрошак енергије. Објашњен је значај употребе имобилизованих ензима за виšekратну употребу у шаржним или дуготрајну употребу у континуалним биореакторима. Магнетне честице омогућавају лаку манипулацију катализатором у рекатору и олакшавају издвајање ензима из реакционог медијума. Полимерна превлака на магнетним честицама ствара повољну микрооколину за дејство ензима, стабилизује честице носача и штити од спољашњих оштећења. Због лаке синтезе, флексибилности, стабилности и проводљивости полианилин је нашао примену у биотехнологији као носач или превлака носача за имобилизацију ензима. Предмет дисертације био је испитивање имобилизације α -амилазе на магнетним честицама, магнетним честицама са полианилинском превлаком, на полианилину једноставним поступком адсорпције и примена у шаржној и континуалној хидролизи скроба.

У **Теоријском делу**, који је подељен у више потпоглавља дат је преглед литературе о амилазама, скробу као амилолитичком супстрату, синтези и карактеристикама магнетних честица и полианилина, формирању полимерне превлаке на магнетним честицама, о адсорпцији и имобилизацији α -амилазе и утицају ултразвука на активност ензима. Објашњена је грађа скроба као основног супстрата на који делују α -амилазе. Затим је објашњена грађа α -амилаза и механизам деловања са посебним освртом на α -амилазу из *Bacillus licheniphormis*. Наведене су особине најчешћих оксида гвожђа, као и начини синтезе. Указано је на значај примене полимерне превлаке на магнетним честицама за имобилизацију ензима. Објашњена је предност примене полианилина као и начини његове хемијске и електрохемијске синтезе.

Експериментални део подељен је на **Материјале** и **Методe**. У првом делу дат је преглед коришћених реагенса и њихових произвођача. У другом делу наведене су коришћене методе као и инструменти током израде докторске дисертације према редоследу експерименталног рада и начину приказивања резултата. Прво су описани поступци синтезе носача честица полианилина хемијским и електрохемијским поступком, магнетних честица, затим магнетних честица пресвучених полианилином. Наведене су методе којима су карактерисане честице носача и методе којима је карактерисан ензим. Описане су методе праћења ензимске активности и садржаја заосталих протеина у раствору. Објашњена је метода имобилизације ензима и оптимизације услова (време, почетна концентрација ензима, pH и температура) имобилизације. Приказане су калибрационе криве за одређивање

концентрације супстрата, садржаја протеина по Лрију (Lowry), као и садржаја протеина мерењем карактеристичних апсорбанци на 255 nm. Дата је шема и слика проточног биореактора са пакованим слојем биокатализатора са повратним и континуалним током коришћеног за испитивање хиролизе скроба.

Резултати и дискусија је поглавље у коме су приказани добијени експериментални резултати, који су дискутовани и објашњавани поређењем са литературним подацима. Ово поглавље је подељено у неколико потпоглавља: **1) Синтеза и карактеризација честица носача, 2) Карактеризација α -амилазе из ензимског препарата Termamyl, 3) Иммобилизација α -амилазе, 4) Стабилност иммобилисане α -амилазе.** У првом потпоглављу описана је морфологија добијених честица носача. Дати су фотографски снимци синтетисаних магнетних честица копреципитацијом гвожђе(III)хлорида и гвожђе(II)сулфата у базној средини (MAG), магнетних честица обложених полианилином (MAG-PANI) и честица полианилина (PANI). На основу SEM микрографија указано је да су синтетисане MAG честице хетерогени агрегати наночестица мањих од 100 nm. Микрографије честица MAG-PANI су показале да је полимеризацијом анилина створена фина влакнаста структура на површини MAG. Приказани су фотографски снимци издвајања MAG и MAG-PANI из реакционог медијума под дејством спољашњег магнетног поља у различитим временским интервалима. Дате су хистерезисне криве за MAG и MAG-PANI на температурама од 5 K и 300 K. Анализиране су успостављене интеракције између честица MAG и MAG-PANI анализом FTIR спектра, при чему разлике FTIR спектра доказују структурне промене узроковане полимеризацијом анилина на магнетним честицама. Приказани су графици карактеризације расподеле величине честица MAG и MAG-PANI као и вредности зета потенцијала. Честице MAG карактерисала је бимодална, а честице MAG-PANI тримодална расподела величина. Анализом графика расподеле зета потенцијала честица носача закључено је да полимерна превлака доприноси стабилизацији магнетних честица. У подпоглављу **Карактеризација ензимског препарата α -амилазе Termamyl** приказани су снимљени UV, IR спектри Termamyl-а, расподеле величине честица и зета потенцијала α -амилазе из ензимског препарата. UV спектар ензимског препарата показао је да α -амилаза има карактеристичан максимум на 255 nm, што је допринело прецизнијем одређивању садржаја заосталог протеина у раствору на основу карактеристичних апсорбанци у UV области. У потпоглављу **Иммобилизација α -амилазе** дати су графици оптимизације услова иммобилизације, испитивањем времена, почетне концентрације ензима, pH, температуре. Добијени експериментални резултати адсорпције моделовани су различитим адсорпционим изотермама при чему је најбоље слагање показао Ленгмиров модел адсорпције. Табеларно су приказани и параметри адсорпционих изотерми и дискутовани су резултати са аспекта

хомогености површине носача као и његовог капацитета за везивање протеина. Табеларно су приказани и резултати испитивања утицаја јона калцијума на имобилизацију α -амилазе, при чему је показано да јони калцијума, поред тога што утичу на смањење масе везаног ензима, доприносе повећању активности добијеног имобилизата. Приказани су кинетички резултати хидролизе скроба добијени са слободном алфа-амилазом и имобилисаном на MAG и MAG-PANI честицама који су моделовани различитим кинетичким моделима. Одређени су кинетички параметри слободне и имобилисане α -амилазе попут Михаелисове константе и максималне брзине реакције на основу којих је упоређена ефикасност система са слободним и имобилисаним ензимом. Табеларно су приказани резултати испитивања утицаја натријум-хлорида и Triton X100 на десорпцију имобилисане α -амилазе.

У потпоглављу **Стабилност имобилисане α -амилазе** дати су резултати рН и температурне стабилности слободног и имобилисаног ензима. Иmobилисана α -амилаза на MAG (MAG-A) и MAG-PANI (MAG-PANI-A) има шири рН профил у односу на нативну α -амилазу (A), при чему је рН профил MAG-PANI-A шири у односу на MAG-A, што указује на то да полианилинска превлака додатно стабилизује имобилисану α -амилазу. Иmobилизација α -амилазе на MAG честицама нема значајан утицај на термичку стабилност, док полимерна превлака доприноси термичкој стабилности тако што се температурни оптимум помера за 10°C у односу на нативну α -амилазу. Приказани су и графици утицаја ултразвучних таласа на активност α -амилазе. Ултразвучни таласи не показују значајан ефекат на активност слободне и имобилисане α -амилазе на MAG, док се уочава његов утицај на α -амилазу имобилисану на MAG-PANI тако што смањује активност овог имобилизата током првих 10 min хидролизе. Дати су прикази оперативне стабилности ензима у шаржном систему току вишестратне употребе, али и током чувања. Показано је да имобилисан ензим задржава $55,5 \pm 1,63$ % почетне активности након 9 сукцесивних коришћења. Графички је описана и оперативна стабилност α -амилазе испитана у проточном биореактору са пакованим слојем имобилисаног ензима на MAG и MAG-PANI честицама у континуалним условима са и без повратног тока. Степен хидролизе скроба није се значајније мењао у току 4 h рада реактора са континуалним током и износио је $88,77 \pm 1,62\%$. Време полу-живота биокатализатора при континуалним условима рада било је 6,2 h. У биореактору са повратим током MAG-PANI-A у првом циклусу током 20 min реакције хидролизује 98,8% скроба. Активност значајно опада након петог циклуса.

Објашњен је утицај величине честица MAG-PANI на активност имобилисане α -амилазе. Са смањењем величине честица носача повећавала се стабилност имобилисане α -амилазе.

амилазе. Сличан тренд уочен је и испитивањем активности имобилисане α -амилазе на честицама полианилина PANI различите величине у шаржним условима.

У поглављу **Закључци** систематично и редоследом према коме су излагани резултати приказани су закључци до којих се дошло током експерименталног рада.

Литература представља списак литературних навода коришћених у литератури према редоследу цитирања кроз дисертацију.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

У савременим погонима скробарске индустрије врши се ензимска хидролиза скроба. Замена киселинске хидролизе ензимском доприноси економичности процеса и добијању чистијих производа. Имобилизацијом α -амилазе може се обезбедити издвајање биокатализатора из реакционог медијума и његова виšekратна употреба што процес ензимске хидролизе чини економски оправданим. Императив је дизајнирање јефтиног, вишефункционалног биокатализаторског система погодног за шаржну и континуалну хидролизу скроба. Адсорпција ензима је најстарија и најјефтинија техника имобилизације без употребе скувих и токсичних реагенса при чему ензим најчешће задржава висок проценат почетне активности. Главна препрека у добијању имобилизата адсорпцијом је десорбовање ензима у присуству јонских супстанци и протеина у раствору, као и неспецифично везивање ензима за носач. Међутим, правилним избором и модификацијом честица носача, као и оптимизацијом услова имобилизације, адсорпција се може унапредити и учинити специфичнијом.

Дизајнирање биокатализаторског имобилисаног система велики је изазов савремене ензимске технологије, с обзиром на комплексност некаталитичког и каталитичког дела система, као и самих интеракција међу њима. Имобилизација α -амилазе на честицама магнетних својстава пружа могућност њеног лаког издвајања из реакционог медијума избегавањем механичког стреса коме су подложни имобилисани ензими током центрифугирања и филтрирања. Магнетне честице дају могућност манипулације биокатализатором дејством спољашњег магнетног поља кроз вискозне растворе смањујући дифузионе лимитације.

У литератури постоји велики број података о различитим материјалима који су се користили за имобилизацију α -амилазе, као и о утицају облика, морфологије, величине носача, броја и врсте функционалних група на имобилизацију. Полианилин је захваљујући лакој синтези, инертности, стабилности, електропроводљивости и ниској цени нашао широку

примену за имобилизацију ензима и добијање биосензора. Испитивања имобилизације трипсина, глукозо-оксидазе, липазе и других ензима на честицама полианилина јасно су показала да се добијају биокатализатори јасно 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. Један од научних доприноса овог рада је управо успостављање корелације 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.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитирана су 145 литературна навода који су омогућили да се представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Савремена истраживања публикована у цитираним научним радовима су приказана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су дали добар увид у могућност примене имобилисане α -амилазе на магнетним честицама са полианилинском превлаком у хидролизи скроба. 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 добијени применом одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и обрадом података. Поступци синтезе честица носача вршени су према познатим литературним подацима уз одређене модификације. Карактеризација честица носача вршена је најсавременијим техникама: SEM, FTIR, SQUID магнетометрије и других. Методом динамичког расипања светлости испитана је расподела величине честица и зета потенцијал.

Мерење зета потенцијала магнетних честица са и без полианилинске превлаке потврдило је хипотезу да полимерна превлака стабилизује магнетне честице. Магнетна својства честица и јачина коерцитивног поља испитани су применом SQUID магнетометрије (суперпроводни квантни интерферометар). Садржај протеина праћен је спектрофотометријски по Лоријевој (Lowry) методи и на карактеристичном апсорпционом максимуму боје снимањем UV спектра.

Активност слободне и имобилисане алфа-амилазе праћена је спектрофотометријском методом испитивањем почетних брзина ензимских реакција на основу мерења апсорбанце промене боје скробно-јодног комплекса током времена. За праћење процеса адсорпције мерен је 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 испитана је праћењем брзине реакције хидролизе скроба при различитим почетним концентрацијама скроба у почетним условима, док су кинетички параметри одређени применом Лајнвивер-Буркове (*Lineweaver-Burk*) методе, Ханес-Вулфове (Hanes Woolf) методе и других. За испитивање оперативне активности коришћен је лабораторијски биореактор са пакованим слојем биокатализатора и са повратним и континуалним током који је омогућавала примена перисталтичких пумпи.

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа литературних података и експерименталних резултата приказаних у оквиру ове дисертације, остварен је практични допринос примени α -амилазе у хидролизи скроба у поређењу са другим описаним експерименталним системима. У оквиру ове тезе упоредо је приказана ефикасност примене α -амилазе из комерцијалног ензимског препарата и имобилисане α -амилазе. У тези је дат и детаљни табеларни преглед до сада постигнутих резултата у имобилизацији α -амилазе на различите носаче, на основу кога се може закључити да развијени имобилисани систем показује одређене предности за практичну примену. Тако, Михаелисова константа за α -амилазу имобилисану на MAG-PANI честицама има изузетно малу вредност која је од 1,4 па до преко двадесет пута мања од вредности за наночестице цинк(II)оксида или полиметилметакрилата, редом. Ова вредност указује на већи афинитет α -амилазе имобилисане на MAG-PANI честицама према скробу у поређењу са другим имобилисаним ензимским системима. У потпуности су оптимизовани услови за добијање имобилисане α -амилазе применом адсорпције на магнетним честицама

пресвученим полианилином. Показан је значај полианилинске превлаке на стабилизацију магнетних честица као и стабилност биокатализатора. Велики допринос добијеног имобилизата огледа се у добијању биокатализатора са великим потенцијалом примене у шаржном биореактору и биореактору са пакованим слојем са рециркулацијом реакционе смеше и у континуалном току. Показано је да имобилисан ензим задржава $55,5 \pm 1,63$ % почетне активности након 9 сукцесивних коришћења у шаржном биореактору. Степен хидролизе скроба није се значајније мењао у току 4 h рада реактора са континуалним током и износио је $88,77 \pm 1,62\%$. Време полу-живота биокатализатора при континуалним условима рада било је 6,2 h. У биореактору са пакованим слојем MAG-PANI честица у првом циклусу током 20 min реакције хидролизује 98,8% скроба. Активност значајно опада након петог циклуса, што је у поређењу са другим резултатима из литературе. Један од бенефита примењеног начина имобилизације, јесте једноставност и економичност поступка без примене скувих и токсичних хемикалија.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Мирјана Н. Радовановић, дипл.инж. технологије пољопривредних и прехранбених производа, је током израде докторске дисертације показала самосталност у креирању и реализацији експеримената, као и анализи и обради резултата. Приликом извођења експеримената показала је и да влада научним и истраживачким методама, као и да поседује потребна стручна, теоријска и практична знања за самосталан научни рад. Приликом развоја постојећих и осмишљавања нових експерименталних поступака, испољила је склоност ка инжењерском начину размишљања. Свеобухватни и систематизовани преглед литературе из области истраживања, показује способност кандидата за самостално откривање и сагледавање отворених проблема истраживања, као и критичку анализу постојећих сазнања. На основу досадашњег ангажовања и остварених резултата, Комисија сматра да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно- истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

У овој тези примењен је хемијски метод синтезе магнетних честица обложених полианилином и утврђени су услови синтезе честица и параметри имобилизације α -амилазе на синтетисаним честицама који су омогућили добијање новог биокатализаторског система са побољшаним својствима у односу на нативну алфа-амилазу. Добијене честице носача

окарактерисане су савременим методама у погледу морфологије, величине и униформности честица, зета потенцијала, магнетних својстава и биокаталитичких својстава. Конкретно, постигнути су следећи научни доприноси:

- Утврђен је утицај методе и параметара синтезе честица на величину честица, њихова морфолошка и магнетна својства и успостављена је корелација између наведених својстава честица и каталитичких својстава биокатализатора;
- Развијен је и оптимизован оригинални поступак имобилизације α -амилазе адсорпцијом на магнетним честицама са и без полимерне превлаке без употребе скувих реагенса;
- испитана је кинетика и механизам адсорпције алфа-амилазе на различите типове магнетних честица, док су добијени кинетички и термодинамички параметри омогућили поређење система и утврђивање капацитета везивања различитих носача;
- Резултати ове тезе доприносе разумевању интеракција алфа-амилазе и магнетних честица са и без полимерне полианилинске превлаке, као и утицају јона калцијума на имобилизацију;
- дефинисани су оптимални параметри имобилизације алфа-амилазе на полианилину и на магнетним честицама са полианилинском превлаком;
- утврђени су кинетички параметри одабараних имобилисаних система са алфа-амилазом у реакцији хидролизе скроба, као и рН, температурни профил и упоређени са слободним ензимом. Одређени кинетички параметри имобилисане α -амилазе указују да полианилинска превлака доприноси бољим кинетичким својствима биокатализатора што може указати да полианилин ствара повољну микрооколину за дејство α -амилаза
- Резултати стабилности имобилисане алфа-амилазе у поновљеним шаржним циклусима као и у континуалним условима доприносе разумевању утицаја и успостављању корелација између величине честица, наелектрисања, магнетних својстава и стабилности биокатализатора;
- Утврђен је значај полианилинске превлаке на кинетичка својстава биокатализатора као и на стабилност имобилисаних магнетних честица у шаржном реактору, и проточном биореактору са пакованим слојем биокатализатора са и без повратног тока.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Дефинисањем циљева истраживања утврђена је методологија истраживања примењена током израде докторске дисертације. Детаљним прегледом доступне литературе из ове области

истраживања која разматра синтезу носача магнетних својстава, честица полианилина и магнетних честица са полимерном превлаком и имобилизације α -амилазе на наведним носачима може се приметити да се добијени резултати надовезују, али и значајно допуњују већ постојеће резултате. На тај начин, ова докторска дисертација представља важан корак ка практичној примени имобилисане α -амилазе у хидролизи скроба и отвара нове могућности за даља истраживања.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Мирјана Н. Радовановић је резултате истраживања остварене у оквиру израде ове докторске дисертације потврдила објављивањем четири рада публикована у часописима међународног значаја или саопштеним на националним скуповима. Резултати истраживања који су део дисертације објављени су до сада у оквиру два рада у међународним часописима и два саопштења на скуповима националног значаја. Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још једног рада у часопису међународног значаја и седам саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

Категорија M22:

1. **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, pp. 427–435, 2016. (IF 1,523) (ISSN 1521-379X)

Категорија M23:

1. **Radovanović M.**, Nikolić M, Đurović V., Jugović B., Gvozdenović M., Grgur B., Knežević-Jugović Z.: *Stabilizacija magnetnih čestica polianilinom i imobilizacija alfa-amilaze*, -Hemijska industrija, 72(1), pp. 1-12, (IF=0,459) (DOI: 10.2298/HEMIND161213016R).

Категорија M63:

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.**Radovanović M.**, Račić B., Knežević-Jugović Z.: *Uticaj vremena i početne koncentracije alfa-amilaze na imobilizaciju sa magnetnim česticama polianilina*, Zbornik radova, XVIII savetovanje o

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Мирјане Радовановић, дипл. инж. технологије под називом „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“ сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на конференцијама од националног значаја. 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 Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „Имобилизација алфа-амилазе на полианилину и магнетним честицама модификованим полианилином“ кандидата Мирјане Радовановић 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 Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

.....
Проф. др Милица Гвозденовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки
факултет

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

.....
Проф. др Мирјана Антов, редовни професор
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет