

Образац 3.

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/143

(Број захтева)

Веће научних области техничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

12.04.2019.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Технолошко инжењерство

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Јелена (Миле) Бебић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Основне студије, Биохемијско инжењерство и биотехнологија

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2000.
-

4. Година уписа на докторске студије: 2016. (Поновни упис на ДАС, трећа година)
-

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др Дејан Безбрадица

Звање: Редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. 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, pp. 97216–97225, 2016 (IF(2015)=3,840) (ISSN 2046-2069).
2. Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., Stojanović, M., Carević, M., Marinković, A., **Bezbradica, D.**: Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 91, pp. 439-448, 2016 (IF(2015)=2,738) (ISSN 0268-2575).
3. Carević, M., **Bezbradica, D.**, Banjanac, K., Milivojević, A., Fanuel, M., Rogniaux, H., Ropartz, D., Veličković, D.: Structural Elucidation of Enzymatically Synthesized Galactooligosaccharides Using Ion-Mobility Spectrometry-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 64, pp. 3609-3615, 2016 (IF(2014)=2,912) (ISSN 0021-8561).
4. Ćorović, M., Milivojević, A., Carević, M., Banjanac, K., Jakovetić-Tanasković, S., **Bezbradica, D.**: Batch and semicontinuous production of L-ascorbyl oleate catalyzed by CALB immobilized onto Purolite® MN102, Chemical Engineering Research & Design, vol. 126, pp. 161-171, 2017 (IF(2017)=2,795) (ISSN 0263-8762).
5. Milivojević, A., Ćorović, M., Simović, M., Banjanac, K., Blagojević, S., Pjanović, R., **Bezbradica, D.**: Novel Approach for Flavonoid Esters Production: Statistically Optimized Enzymatic Synthesis Using Natural Oils and Application in Cosmetics, Industrial & Engineering Chemistry Research, vol. 58, pp. 3640-3649, 2019 (IF(2017)=3,141) (ISSN 0888-5885).

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће

(назив надлежног тела факултета)

на седници одржаној 11.04.2019. године размотрило предложену тему и закључило да је

тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Петар Ускоковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета.

Бр. 20/127-1

28. 09. 2018 год.

БЕОГРАД

На основу члана 101. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета у Београду бр. 201/2018") и члана 76. став 1. и став 4. Статута Технолошко-металуршког факултета у Београду, као и захтева студента за продужење рока за завршетак студија Декан доноси

РЕШЕЊЕ

о продужењу рока за завршетак студија

Студенту ЈЕЛЕНИ БЕБИЋ, број индекса 4029/2016, уписаном-ој у трећу годину докторских академских студија школске 2016/2017. године након истека рока за завршетак студија, продужава се рок за завршетак студија до истека троструког броја школских година потребних за реализацију уписаног студијског програма, односно до краја школске 2018/2019. године.

Поука о правном леку:

Против овог решења именовани-а може поднети жалбу Савету Факултета у року од 8 дана од дана пријема решења.

Доставити:

- Студенту;
- Служби за студентска питања;
- Општој служби – архиви.

примило решење
Јелена Бебић
20.2.2019.

ДЕКАН

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл. 43. Правилника о докторским студијама ТМФ-а, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 11.04.2019. 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 **Јелени Бебић**, дипломираном инжењеру технологије, под називом: „**Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја**“.

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

За ментора се одређује др Дејан Безбрадица, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, уз сагласност Комисије за докторске студије.

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

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Јелене Бебић, дипл. инж. технологије, за израду докторске дисертације

Одлуком Технолошко-металуршког факултета бр. 35/90 од 07.03.2019. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Јелене Бебић, дипл. инж. технологије, а за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **"Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја "**.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Јелена Бебић, дипломирани инжењер технологије, рођена Томовић, 19.1.1975. у Београду. Завршила је основну школу "Старина Новак" и V Београдску гимназију "Др Душица Стефановић". Основне студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 1993/1994. године. Дипломирала на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду 13.12.2000. године, са просечном оценом 8,81 и темом "Утицај састава етарских уља на њихову антимикуробну активност". Докторске студије на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, уписала је 2007. године.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Докторске студије на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, Јелена Бебић је уписала 2007. године под менторством проф. др Славице Шилер-Маринковић. До 2010. године положила је 13 испита укључујући и завршни испит на тему "Антиоксиданси у отпаcima из производње сокова од воћа и поврћа" са просечном оценом 10 током докторских студија и остварених 82 ESPB поена,. Након губитка статуса студента докторских студија, поновно се уписује на 3. годину докторских студија 2016. године, на исти студијски програм, са

ментором др Дејаном Безбрадицом. Следи списак положених испита са бројем остварених ЕСПБ бодова:

Предмет	ЕСПБ	Оцена
1. Површински активне материје	4	10
2. Хемијска кинетика	5	10
3. Одабрана поглавља биохемије - витамини	5	10
4. Биохемијска кинетика	5	10
5. Индустијска микробиологија	5	10
6. Масена спектрометрија	4	10
7. Отпадни органски производи као секундарне сировине	5	10
8. Математичка обрада експерименталних података	6	10
9. Хемијски сензори	5	10
10. Органске загађујуће супстанце	4	10
11. Енглески језик	/	10
11. Пречишћавање отпадних вода	4	10
12. Завршни испит	30	10

На седници Наставно-научног већа Технолошко металуршког факултета од 07.03.2019. године именована је Комисија за оцену подобности теме и кандидата Јелене Бебић за израду докторске дисертације и научне заснованости теме " **Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја**".

Јелена Бебић је руководилац Групе за метрологију у хемији у Сектору за развој метрологије Дирекције за мере и драгоцене метале. У овој установи је запослена од 2001. године, а током дугогодишњег рада у области метрологије била је члан више комисија и одбора на националном нивоу за имплементирање европских стандарда, као и представник Србије у више међународних и европских организација из области метрологије и хемије (EURAMET, EURACHEM, OIML, WELMEC). У оквиру научноистраживачког рада коаутор је једног поглавља у књизи од међународног значаја (M_{14}), једног рада у врхунском међународном часопису (M_{21}), једног рада у истакнутом међународном часопису (M_{22}), једног рада у међународном часопису (M_{23}), као и аутор и коаутор у више саопштења са међународних и националних скупова (три M_{33} , један M_{34} , девет M_{63}).

Монографска студија/поглавље у књизи M_{12} или рад у тематском зборнику међународног значаја (M_{14})

1. I. Altieri, S. Barbizzi, **J. Bebic**, M. Belli, E. Amico di Meane, G. Horvat N. L. Lazić, S. Marinčić, M. Mehović, M. Memic, A. Menditto, T. Muhić-Šarac, M. Patriarca, G. Pistone, M. Sega,

A. Semerar, M. Simonič, B. Tepuš: *Practical Examples on Traceability, Measurement Uncertainty and Validation in Chemistry*, Vol 2. Publication Office of the European Union, 95-131, 2011, ISBN: 978-92-79-18998-2, DOI : 10.2787/36024, ISSN: 1018-5593

Научни радови у врхунским међународним часописима (M₂₁)

1. J. Viallon, P. Moussay, R. Wielgosz, **J. Bebic**, J. E Norris, and F. Guenther.: "*Final Report, on-Going Key Comparison BIPM.QM-K1: Ozone at Ambient Level, Comparison with DMDM, July 2015.*", Metrologia 53 08006., 1-14, 2016, IF(2016)= 3,411

Научни радови у истакнутом међународним часописима (M₂₂)

1. M. Archer, M. Fernandes-Whaley, R. Visser, J. de Vos, S. Prins, A. Rosso, M. Ruiz de Arechavaleta, I. Tahoun, E. Kakoulides, C. Luvonga, G. Muriira, E. Naujalis, O. Bin Zakaria, M. Buzoianu, **J. Bebic**, B. Achour Mounir, N. Huy Thanh: *Final report on AFRIMETS.QM-K27: Determination of ethanol in aqueous matrix.* Metrologia 50 08020 1-40, 2013., doi: <https://doi.org/10.1088/0026-1394/50/1A/08020> , IF(2013)= 1,653

Научни радови у међународним часописима (M₂₃)

1. D. Bezbradica, **J. Tomovic**, M. Ristic, M. Vukasinovic, S. Siler-Marinkovic: "*Composition and antimicrobial activity of essential oil of Satureja montana L. collected in Serbia&Montenegro*", J. Essent. Oil Res. 17, 462-465, 2005. IF(2005)= 0,367

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M₃₃)

1. A. Furtado, J. Pereira, M. Schiebl, G. Mares, G. Popa, P. Bartos, **J. Bebic**, E. Lenard, A. Alic, S. Alisic, P. Neuvonen, H. Wolf, G. Sariyerli, A. Bescupschii, B. Laky: *Establishing traceability for liquid density measurements in Europe: 17RPT02-rhoLiq a new EMPIR joint research project*, Journal of Physics: Conference Series 1065 (2018) 082013, 1-5, 2018, doi:10.1088/1742-6596/1065/8/082013, ISSN: 1742-6588

2. **J. Bebic**, D. Nikolic: *Existing National/Reference Measurement Capability for Gas Composition Measurements in Serbia and Montenegro*, "Balkan Workshop Reference Infrastructure for Gas measurements in Balkan Countries", Zbornik radova, Sofija, 2004.

3. D. Nikolic, **J. Bebic**, T. Koldzic: *Realizacija akreditovane laboratorije u JKP "Beogradske elektrane" Beograd za etaloniranje analizatora gasova za merenje emisija zagađujućih gasova iz stacionarnih izvora*, "Balkan Workshop Reference Infrastructure for Gas measurements in Balkan Countries", Zbornik radova, Sofija, 2004.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M₃₄)

1. R. Philipp, K. Topal, M. Calzado, **J. Bebic**, B. Lalere, *EMPIR project ALCOREF - certified forensic alcohol reference materials*, Izlaganje na Kongresu BERM-15 International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials, Berlin, 2018.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M₆₃)

1. **J. Bebić**: *Sledivost analitičkih merenja do međunarodnog i nacionalnog nivoa*, Seminar "Laboratorijski menadžment i akreditacija prema ISO 17025 standardu", Zbornik radova, Beograd, 2003.

2. **J. Bebić**, D. Nikolić: *Međunarodna preporuka OIML R 99/ISO 3930 za ispitivanje analizatora izduvnih gasova iz benzinskih motora*, "Peto savetovanje o unapređenju policijske prakse u bezbednosti saobraćaja", Zbornik radova, Kladovo, 2007.

3. **J. Bebić:** *Metrologija u hemiji u Evropi*, Kongres Metrologa, Zbornik radova Zlatibor, 2007.
4. D. Nikolić, **J. Bebić:** *Međunarodna preporuka OIML R 126 za za ispitivanje etilometara*, Peto savetovanje o unapređenju policijske prakse u bezbednosti saobraćaja, Zbornik radova, Kladovo, 2007.
5. **Bebić, J. :** *Klasifikacija referentnih materijala, njihova proizvodnja i upotreba*. Singidunum revija, 8 (2), 173-179, 2011, ISSN: 1820-8819
6. **J. Bebic** , **J. Koldzic T.:** *Measurement uncertainty of calibration of gas analyzers for stationary sources emissions and evaluation of performance of accredited laboratory in this field*, Metrology Congress 2013, Proceedings, Borsko jezero, 2013
7. N. Skundric, **J. Bebic**, *POTVRĐIVANJE REFERENTNIH RASTVORA ETANOLA U VODI*, Zbornik radova, International convention on quality, JUSK, Belgrade, Serbia, 2013.
8. **J. Bebic**, N. Skundric, *ETALONIRANJE FOTOMETARA ZA MERENJE NIVOVA AMBIJENTALNOG OZONA U DIREKCIJI ZA MERE I DRAGOCENE METALE*, Zbornik radova, International convention on quality, JUSK, 107-113, 2015, Beograd, Srbija
9. **J. Bebic**, L. Gazevic, C. Blaul: *PROLAB SOFTWARE FOR DATA EVALUATION OF INTERLABORATORY STUDIES*, Zbornik radova, International Journal of Advanced quality, JUSK, No.3 Vol.44 2016, 22-27, 2016. ISSN: 2217-8155

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и постигнутих резултата током последипломских студија, Јелена Бебић, дипломирани инжењер технологије, показала је изразиту склоност ка бављењу научно-истраживачким радом. У проналажењу литературе, креирању методологије и динамике истраживања, демонстрирала је висок степен самосталности и савесно је обављала поверене задатке. Такође, тема докторске дисертације припада области примене биотехнологије на заштиту животне средине, којом се кандидаткиња бавила и током израде дипломског рада и докторских студија, а у оквиру професионалне каријере је упозната са законском регулативом у овој области. Поред тога, у овој дисертацији биће неопходна идентификација и квантификација деградационих производа добијених биотехнолошким поступцима разлагања загађујућих материја где ће од великог значаја бити досадашње научноистраживачко искуство кандидата у области метрологије из којег је проистекло поглавље у књизи од међународног значаја (M12), један рад у међународном часопису (M23) и три саопштења са националног скупа штампано у целини (M63) којих је коаутор. У оквиру научно-истраживачког рада у току докторских студија објавила је рад (као коаутор) у истакнутом међународном часопису (M22) који се односи на инструменталне аналитичке методе које су део истраживања у оквиру предложене докторске дисертације, што упућује на закључак да је кандидаткиња врло компетентна за рад на предложеној теми докторске дисертације. Њену склоност ка научноистраживачком раду поврћује и чињеница да је коаутор још једног рада у врхунском међународном часопису (M21) који није интегрални део будуће дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је имобилизација лаказа различитог порекла са циљем примене у разградњи органских загађујућих материја. Основни циљ је добијање нових имобилисаних ензимских препарата лаказа, као и упоређивање могућности њихових примена на разградњу органских загађујућих материја, као што су хлорирани пестициди, нафтален, индустријске боје или полициклични ароматични угљоводоници.

Лаказа (ЕС 1.10.3.2, бензендиол:оксидоредуктаза) је ензим који припада групи оксидоредуктаза, а од све већег је значаја јер каталитичку активност показује у оксидацији великог броја органских супстрата (укључујући феноле, анилине и ароматична тиолна једињења) и неких неорганских једињења. Карактеристике самог ензима, као и његова структура, зависе од порекла ензима, и могу да битно варирају. Заједничка карактеристика је да садрже атоме бакра који су им неопходни за каталитичко дејство, а број атома бакра зависи од порекла. Најважнији продуценти овог ензима су гљиве које учествују у труљењу дрвета, као што су *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta* и друге, али се овај ензим може наћи и у бактеријама, лишајевима, инсектима, прокариотама и вишим биљкама, углавном као екстрацелуларни ензим. Повећано интересовање за истраживања лаказа везано је управо за њихову ниску специфичност према супстрату, односно за могућност оксидације органских загађујућих материја, међу којима су и фенолна једињења. Ова особина лаказа чини их потенцијалним индустријским ензимима у многим применама, као што је биоремедијација земљишта и вода.

Фенолна једињења су широко заступљена у природи, нарочито у прехранбеним производима. Међутим, нека од њих спадају у групу опасних загађивача животне средине и могу се наћи у отпадима из индустрије прераде нафте, угља, маслиновог уља и вина, као и из производње боја, текстила, и других производа. Ова једињења сматрају се токсичним за водене организме, и због тога су нека од њих, као што су полициклични ароматични угљоводоници, предмет регулативе као органске загађујуће материје од стране Европске комисије, као и регулативе САД. Хлоровани феноли и њихови деривати су хемикалије, које подражавају дејство хормона код дивљих животиња и људи, тиме производећи негативан утицај на репродуктивну функцију. Органохлорни пестициди су такође загађујуће материје, за које су стављање у промет и употреба дефинисани законском регулативом, због своје токсичности, а неретко и канцерогености. Инсектицид линдан има примену у третирању воћа и поврћа, семена, у шумарству као и за лечење стоке и кућних љубимаца. По питању животне средине, он спада у перзистентне органске загађиваче пошто се дуго након употребе задржава у природи, по питању дејства на људе спада у токсичне материје. Иако су промет и употреба овог пестицида у многим земљама забрањени, као и у Србији, постоје контаминирани локације где је његова концентрација далеко изнад законом дозвољене. Из тог разлога ће циљ ове дисертације бити искоришћење биокаталитичке активности лаказа према овим супстратима за разградњу ових једињења.

Интензивнија индустријска примена лаказа, између осталог и у процесима биоремедијације, је ограничена ниском стабилношћу и ограниченом могућношћу продужене употребе ензима. Генерално, слободне ензимске форме су склоне денатурисању под екстремним експерименталним условима температуре, рН, јонске јачине раствора или у присуству хемикалија у самом индустријском процесу. У циљу превазилажења ових проблема, врши се имобилизација ензима, која је неопходна за многе индустријске примене. Имобилизација ензима подразумева везивање ензима физичким или хемијским путем на површину носача или „заробљавање“ унутар структуре носача. Имобилизацијом се добија ензим повећане каталитичке активности у односу на слободни ензим, а омогућава се лако изоловање ензима из реакционе смеше и употреба у више реакционих циклуса чиме се директно смањује цена ензимских процеса на индустријском нивоу. Постоји више метода за имобилизацију ензима, али најчешће се користе имобилизација путем физичке адсорпције ензима и имобилизација путем стварања ковалентних веза између функционалних група носача и ензима. Процес имобилизације ензима зависи од расподеле бочних аминокиселинских остатака на површини ензима и од оптималне концентрације функционалних група на површини носача. Ове функционалне групе на површини носача треба да имају велики афинитет према аминокиселинским остацима ензима, а да буду инертне према супстратима, производима реакције и растварачу. У циљу повећања броја или увођења нових реактивних функционалних група (амино, епокси, карбоксилне и глутаралдехидне групе) врши се хемијска модификација површине носача. Хемијском модификацијом површине носача могу

се побољшати и физичко-механичке особине носача чиме се омогућава шира примена носача на индустријском нивоу.

Из објављених резултата истраживања може се закључити да је лаказа била успешно имобилисана на различите носаче укључујући микросфере, угљеничне наноцеви, графитни прах и друге материјале. Последњих година све више се као носачи за имобилизацију ензима користе природни или синтетски наноматеријали.

Тренутно се у резултатима истраживања може пронаћи неколико типова наноматеријала који се користе као носачи за имобилизацију ензима као што су нпр. наноцеви, нановлакна, наночестице (порозне и непорозне), нанокмпозитни материјали, материјали добијени сол-гел трансформацијама који садрже честице нано-димензија и “single-enzyme” наночестице. Показало се да ензими имобилисани на наноматеријале имају поред боље активности и неупоредиво бољу стабилност у поређењу са ензимима имобилисаним на конвенционалне носаче. Ови нанобиокатализатори су због својих добрих карактеристика нашли примену у фармацији, медицини, текстилној индустрији и др. Међутим, велики трошкови и комплексна процедура синтезе наноматеријала су главне препреке за њихову ширу примену у процесима на индустријском нивоу.

Наночестице, од свих наведених типова наноматеријала имају најширу примену, а користе се као носачи за различите биомолекуле јер су хемијски стабилне, униформне величине, добро се диспергују у течностима, имају велику специфичну површина по јединици масе, минимална дифузиона ограничења, омогућавају максималну количину везаног ензима, и имају могућност хемијске модификације површине. Ове карактеристике чине их идеалним носачима за имобилизацију ензима. Носач из групе наночестица који по својим карактеристикама истиче је наносилика модификована органосиланима, која је тренутно испитана са неколико различитих ензима.

Циљ ове дисертације је испитивање и оптимизација имобилизације лаказа различитог порекла на различите носаче, као и испитивање примене добијених ензимских препарата на смањење концентрације органских загађујућих материја. Биће примењено неколико група носача за имобилизацију: наночестице силике функционализоване органосиланима, полиметакрилатне микрочестице функционализоване аминокиселинским групама и лигнинске микросфере. Последњих година објављени су резултати бројних истраживања која се са различитих аспеката баве проблематиком имобилизације и примене лаказа. У даљем тексту наведени су само најважнији од њих, који су представљали основу за планирање експерименталног рада у оквиру израде ове докторске дисертације:

- [1] X. Feng, W. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram, E. I. Solomon, „A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability“, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1292, pp. 303-311, 1996.
- [2] A. P.M. Tavare, C. G. Silva, G. Drazic, A. M.T. Silva, J. M. Loureiro, J. L. Faria, „Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies“, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 454, pp. 52–60, 2015.
- [3] M. Fernández-Fernández, M. Á. Sanromán, D. Moldes, „Recent developments and applications of immobilized laccase“, *Biotechnology Advances*, vol. 31, pp. 1808–1825, 2013.
- [4] C. Johannes, A. Majcherczyk, A. Huttermann, „Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system“, *Journal of Biotechnology*, vol. 61, pp. 151–156, 1998.
- [5] S. L. Gilani, G. D. Najafpour, A. Moghadamni, A. H. Kamaruddin, „Kinetics and Isotherm Studies of the Immobilized Lipase on Chitosan Support“, *International Journal of Engineering (IJE), TRANSACTIONS A: Basics*, vol. 29, No. 10, pp. 1319-1331, 2016.
- [6] P. Baldrian, „Fungal laccases ^occurrence and properties“, *FEMS Microbiol Rev*, vol. 30, pp. 215–242, 2006.

- [7] R. C. Minussi, G. M. Pastore, N. Duran, „Potential applications of laccase in the food industry“, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 13, pp. 205–216, 2002.
- [8] S. Ilyas, A. Rehman, „Decolorization and detoxification of Synozol red HF-6BN azo dye, by *Aspergillus niger* and *Nigrospora* sp“, *Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, pp. 10-12, 2013.
- [9] N. Durán, M. A. Rosa, A. D’Annibale, L. Gianfreda, „Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review“, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 31, pp. 907–931, 2002.
- [10] A. Majcherczyk, C. Johannes, A. Huttermann, „Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*“, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 22, pp. 335–341, 1998.
- [11] M. M. Rodríguez-Delgado, G. S. Alemán-Nava, J. M. Rodríguez-Delgado, G. Dieck-Assad, S. O. Martínez-Chapa, D. Barceló, R. Parra, „Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds“, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 21–45, 2015.
- [12] M. Alcalde, M. Ferrer, F.J. Plou, A. Ballesteros, „Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes“, *Trends in Biotechnology*, vol. 24, No. 6, pp. 281–287, 2006.
- [13] S. Kumaravel, P. Praveen Kumar, P. Vasuki, „GC-MS Study on Microbial Degradation of Lindane“, *International Journal of Applied Chemistry*, volume 6, number 3, pp. 363–366, 2010.
- [14] M. V.N. Rodrigues, F. G. R. Reyes, P.M. Magalhães, S. Rath, „GC-MS Determination of Organochlorine Pesticides in Medicinal Plants Harvested in Brazil“, *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 18, no. 1, pp. 135–142, 2007.
- [15] D. Wesenberg, I. Kyriakides, S. N. Agathos, „White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents“, *Biotechnology Advances*, vol. 22, pp. 161–187, 2003.
- [16] C. Mousty, L. Vieille, S. Cosnier, „Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor“, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 1733–1738, 2007.
- [17] T.T. Xia, C.Z. Liu, J.H. Hu, C. Guo, „Improved performance of immobilized laccase on amine-functioned magnetic Fe₃O₄ nanoparticles modified with polyethylenimine“, *Chemical Engineering Journal*, vol. 295, pp. 201–206, 2016.
- [18] K. Banjanac, M. Mihailović, N. Prlainović, M. Stojanović, M. Carević, A. Marinković, D. Bezbradica, „Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase“, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 91 (2), pp. 439–448, 2016.
- [19] S. Z. Mazlan, S. A. Hanifah, „Effects of Temperature and pH on Immobilized Laccase Activity in Conjugated Methacrylate-Acrylate Microspheres“, *International Journal of Polymer Science*, volume 2017, article ID 5657271, 8 pages.

3. Полазне хипотезе

Прегледом актуелне научне периодике установљено је да лаказе катализују оксидацију органских загађујућих материја, међу којима су и хлорирани пестициди, нафтален, индустријске боје или полициклични ароматични угљоводоници, што указује на њихов висок потенцијал за примену у биоремедијацији земљишта и вода. Велику препреку широј примени представља висока цена ензимских препарата, што се делимично може превазићи применом имобилизованих лаказа. Истраживања о имобилизацији лаказа су у највећем делу изведена са лаказом изолованом из *T. versicolor*, а примењен је велики број носача и различити типови имобилизационих техника, као што су: инкапсулација у алгинатне и хитозанске честице, адсорпција на различите неорганске носаче и ковалентна имобилизација на различите природне и синтетичке полимере функционализоване увођењем карбонилних или аминокислиних група. Све већи број експерименталних истраживања је посвећен имобилизацији овог ензима на наноматеријале чија највећа предност је велика специфична површина која

омогућава имобилизацију високих концентрација ензима и већу имобилисану ензимску активност од ензима имобилисаних на конвенционалне носаче. Велика пажња се посвећује синтези наноматеријала који се користе као носачи за имобилизацију ензима како би се добили материјали који су биокompatibilни, нетоксични и биодеградибилни. Треба напоменути да производи добијени употребом таквих нанобиокатализатора добијају епитет „зелених“, тј. еколошки прихватљивих. Највише се користи физичка адсорпција која у већини случајева, услед стварања слабих интеракција између ензима и носача, доводи до ниже стабилности имобилисаног ензима током експлоатације чиме је смањена могућност шире примене на индустријском нивоу. Ређе се прибегава ковалентној имобилизацији заснованој на хемијској модификацији површине носача при чему долази до увођења нових реактивних функционалних група на њихову површину. У овако добијеним препаратима, утицај модификације на активност имобилисаног ензима зависи од типа функционалне групе, распореда аминокиселинских остатака на површини ензима, карактеристика површине носача и услова средине.

Основне хипотезе које се могу издвојити као полазна основа за започињање научноистраживачког рада у оквиру ове дисертације су следеће:

- Фокус истраживања биће на примени препарата лаказе из *Myceliophthora thermophila* експримиране у *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003) који је погодан за индустријску примену због ниже цене од препарата који се претежно анализирају у литературним изворима и задовољавајуће ензимске активности. Биће изведена карактеризација ензима одговарајућим инструменталним методама да би се оптимизовала активност овог ензима и олакшао избор носача за његову имобилизацију.
- Основни предуслов за интензивнију индустријску примену било ког ензима, а самим тим и лаказе, представља могућност имобилизације. У оквиру ове дисертације биће примењено више носача за имобилизацију и имобилизационих техника. Приликом евалуације добијених имобилисаних ензима анализираће се њихова активност, стабилност на високим температурама и оперативна стабилност. При процени активности биће праћени следећи параметри: концентрација имобилисаних протеина (mg/g носача), концентрација имобилисане активности (IU/g носача), принос имобилизације протеина (%) и принос имобилизације активности (%). Овакав избор излазних величина ће омогућити да се добијени резултати искористе и за формирање хипотеза о механизму везивања ензима, поред очигледне могућности избора имобилисаног ензима највеће активности за даљу употребу.
- Неопходно је спровести прелиминарну студију могућности имобилизације лаказе на различите носаче и испитати активности имобилисаних ензима у циљу утврђивања оптималног носача који би се користио у другој фази рада. У оквиру ове дисертације биће испитан врло широк дијапазон носача за имобилизацију који се разликују по димензијама (микрочестице и наночестице), порозности (микропорозни и макропорозни носачи), хидрофилности и врсти функционалних група на површини честица. Компаративна студија активности имобилисаног и слободног ензима ће омогућити и увид у механизме имобилизације лаказа користећи при томе познате тродимензионалне структуре ових протеина и распоред аминокиселинских остатака на површини ензима. Лаказе из *Trametes versicolor* као и *Myceliophthora thermophila* биће имобилисане на неколико носача из серије Lifetech™. Биће примењене макропорозне честице са примарним амино групама на површини које се разликују у величини пора (30-60 nm или 60-120 nm), макропорозне честице са оксиранским групама на површини и хидрофобне макропорозне честице са октадеканском ножицом. Поред тога, биће испитана и могућност примене лигнинских микросфера, носача који су изузетно погодни за примене у ензимским процесима из области заштите животне средине јер се добијају из материјала природног порекла. На површини ових честица ће бити слој полиетиленимина који ће им омогућити присуство амино група на површини и ефикаснију имобилизацију. Такође, биће примењени и

макропорозни носачи из серије Purolite™, који имају примарну amino групу, а биће испитана и њихова модификација глутаралдехидом ради увођења алдехидних група на површину носача. Ове честице имају димензије и густину погодну за употребу у проточним реакторима, па ће бити испитана и могућност примене најпогоднијих добијених препарата имобилисаних лаказа у биореакторима са пакованим или флуидизованим слојем имобилисаног ензима. У имобилизацији лаказа на носаче са amino групама биће испитана и могућност хемијске модификације угљенохидратне фракције ензима перјодатном методом којом се добијају алдехидне групе на површини ензима и омогућује успостављање ковалентних веза између ензима и носача.

- Последњих година све више се као носачи за имобилизацију ензима користе природни или синтетски наноматеријали, као што су наноцеви, нановлакна, наночестице (порозне и непорозне), нанокомпозитни материјали, материјали добијени сол-гел трансформацијама који садрже честице нано-димензија и “single-enzyme” наночестице. У овој дисертацији биће коришћене комерцијалне непорозне наночестице силике Aerosil 380 које ће бити модификоване увођењем различитих функционалних група. Површина SiO₂ наночестица је јако хидрофилна јер се на њој налазе силанол групе, па се ензим на њих може везати искључиво адсорпцијом помоћу Ван дер Валсових сила или водоничних веза. Хемијском модификацијом, применом реакције силанизације, помоћу органосилана на површину ових наночестица могу се увести различите органске функционалне групе. Предности коришћења наночестица SiO₂ као носача за имобилизацију ензима су велика контактна површина, одсуство дифузионих ограничења и могућност везивања велике количине ензима и значајно веће ензимске активности. У првом кораку модификације наночестице силике биће активирани помоћу органосилана који садрже amino или оксиранске групе. Уведене amino групе ће бити додатно третиране цијанурил-хлоридом при чему долази до увођења хлоридних група на површину наночестица. Биће испитан утицај најважнијих фактора модификација (као што су температура, време трајања реакције и концентрације amino, епокси-органосилана и цијанурил-хлорида) са циљем добијања што активнијих и стабилнијих имобилисаних препарата лаказа. И у овом делу истраживања биће испитано да ли се модификацијом угљенохидратне фракције ензима перјодатном методом може повећати ефикасност имобилизације на носаче са amino групом.
- Могућност примене добијене имобилисане лаказе као и слободне лаказе, биће испитана у ензимским реакцијама оксидо-редукције са различитим супстратима који се сврставају у органске загађујуће материје. Као супстрати биће примењени линдан, нафтаген, полициклични ароматични угљоводоници, индустријске боје и др. Прелиминарна оптимизација ензимске деградације биће заснована на праћењу смањења концентрације загађујуће материје, а у каснијим фазама истраживања биће анализирани и деградациони производи одговарајућим инструменталним методама ради процене њиховог утицаја на животну средину.

4. Научне методе истраживања

За анализу ефикасности имобилизације биће неопходно праћење концентрације протеина и активности лаказе током имобилизације, које ће бити одређиване стандардним спектрофотометријским методама. Концентрација протеина биће одређивана спектрофотометријским методом по Бредфорду. Потпуна карактеризација слободног ензима лаказе биће извршена коришћењем 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS) као супстрата, који ће се користити и за оптимизацију имобилизације лаказе. За одређивање изоелектричне тачке ензима биће примењен Zetasizer. Активност лаказе у реакцијама разградње органских загађујућих материја биће праћена течном хроматографијом високих перформанси (HPLC) као и гасном хроматографијом са масеном детекцијом (GC-MS), а деградациони производи биће анализирани течном хроматографијом

високих перформанси са масеном детекцијом (HPLC-MS). Ефекти модификације носача и имобилизације ензима биће анализирани и спектроскопском анализом (FTIR, TGA и SEM).

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос на пољу примене лаказе у биотехнолошким процесима деградације органских загађујућих материја добијањем економичнијих и ефикаснијих имобилисаних препарата лаказа. У оквиру истраживања може се очекивати неколико основних доприноса:

- Развој поступака за имобилизацију лаказа на функционализоване полиметакрилатне и полистиренске носаче, као и лигнинске микросфере. У оквиру овог дела истраживања биће испитани носачи са различитим функционалним групама па ће резултати допринети расветљавању механизма имобилизације лаказа и омогућити бољу селекцију носача за имобилизацију за наредна истраживања. Добијени имобилисани препарати биће окарактерисани из аспекта активности лаказе и стабилности на високим температурама, као и могућности употребе у више реакционих циклуса. Најефикаснији препарати биће употребљени у проточним реакторима са пакованим или флуидизованим слојем ензима.
- Развој поступака за имобилизацију лаказа на наночестице силике. Биће оптимизовани најбитнији параметри модификације (температура, време реакције, концентрација агенса за модификацију) који омогућавају довољну концентрацију функционалних група на површини наночестица, а да се истовремено избегну нежељене споредне реакције умрежавања које доводе до смањења активности имобилисаног ензима.
- Развој поступака ензимске деградације органских загађујућих материја помоћу имобилисаних лаказа. Биће испитани представници различитих група загађујућих материја (пестициди, полициклични ароматични угљоводоници и индустријске боје), а процеси ће бити оптимизовани при концентрацијама загађивача у реалним ефлуентима. Поред брзине деградације производа биће праћени и продукти разградње ради процене њиховог утицаја на животну средину.

6. План истраживања и структура рада

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је имобилизација лаказа различитог порекла са циљем примене у разградњи органских загађујућих материја. Основни циљ је добијање нових имобилисаних ензимских препарата лаказа, као и анализа могућности њихових примена на разградњу органских загађујућих материја, као што су хлорирани пестициди, нафтаген, индустријске боје или полициклични ароматични угљоводоници. Током израде дисертације као носачи за имобилизацију биће примењени функционализовани полиметакрилатни и полистиренски носачи, функционализоване лигнинске микросфере и хемијски модификована непорозна пирогена наносилика. Као модификујући агенси за наносилику биће коришћени органосилани са аминок или оксиранским групама. Тако добијени имобилисани ензими биће испитани у циљу примене за процесе биоремедијације.

Предвиђа се да ће у докторској дисертацији бити обрађена следећа поглавља: *Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак, Литература*.

У поглављу *Увод* биће дефинисан предмет и главни циљеви истраживања, биће дат кратак осврт на подручје истраживања као и допринос дисертације. Поглавље *Теоријски део* обухватиће анализу досадашњих резултата истраживања на основу прегледа литературе из области дисертације. У *Експерименталном делу* биће наведени материјали, уређаји и методе коришћене у експерименталном раду при изради дисертације. У поглављу *Резултати и дискусија* биће приказани и дискутовани резултати експеримената, међу којима су

карактеризација лаказе, оптимизација имобилизације, кинетика адсорпције ензима на носач, активност имобилисаног ензима и његова примена у разградњи органских загађујућих материја. У *Закључку* ће бити сумирани закључци добијени на основу изведених испитивања, са акцентом на њихове основне доприносе. У делу *Литература* биће наведене референце цитиране у дисертацији.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације под насловом „**Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја**” коју је предложила Јелена Бебић, дипл. инж. технологије, научно утемељена и да представља значајан допринос научној области Технолошко инжењерство, ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидаткињи Јелени Бебић одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. За ментора се предлаже др Дејан Безбрадица, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 05.04.2019.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

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

.....
Др Милица Симовић (рођ. Царевић),
научни сарадник
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Катарина Бањанац, научни сарадник
Универзитет у Београду,
Иновациони центар Технолошко-металуршког
факултета

.....
Др Јелена Русмировић, научни сарадник,
Војнотехнички институт