

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/369

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

11.01.2022.

(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:

Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Милица (Бобан) Вељковић

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

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Мастер студије, Мастер инжењер технологије

3. Година завршетка претходног нивоа студија: 2018.

4. Година уписа на докторске студије: 2018.

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:

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Carević M., **Bezbradica D.**, Banjanac K., Milivojević A., Fanuel M., Rogniaux H., Ropartz D., Veličković, D. (2016) Structural elucidation of enzymatically synthesized galactooligosaccharides using ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 3609-3615. (ISSN: 0021-8561; IF=3,154)
2. Carević M., Veličković D., Stojanović M., Milosavić N., Rogniaux H., Ropartz D., **Bezbradica D.** (2015) Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* 50: 782-788. (ISSN:1359-5113; IF=2,529)
3. Banjanac K., Carević M., Ćorović M., Milivojević A., Prlainović N., Marinković A., **Bezbradica D.** (2016) Novel β -galactosidase nanobiocatalyst systems for application in the synthesis of bioactive galactosides. *RSC Advances* 6: 97216–97225. (ISSN: 2046-2069; IF=3,840)
4. Banjanac K., Mihailović M., Prlainović N., Ćorović M., Carević M., Marinković A., **Bezbradica D.** (2016) Epoxy silanization – tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 91: 2654-2663. (ISSN: 0268-2575; IF=3,135)
5. Carević M., Veličković D., Stojanović M., Milosavić N., Rogniaux H., Ropartz D., **Bezbradica D.** (2015) Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* 50: 782-788. (ISSN:1359-5113; IF=2,529)

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф.дрПетарУскоковћ

- 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

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 23.12.2021. 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 **Милице Вељковић**, број индекса 4003/2018, под називом: „**Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида**“.

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.

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

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Технолошко-металуршки факултет

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Милице Вељковић, мастер инжењера технологије, за израду докторске дисертације

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета бр. 35/296 од 18.11.2021. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Милице Вељковић за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **„Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида“**.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Милица Вељковић, мастер инжењер технологије, рођена је 13. новембра 1994. године у Пироту где је завршила основну школу „8. септембар“ и Пиротску гимназију. Основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2013/2014. године, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Дипломирала је у септембру 2017. године, са просечном оценом 9,40 и оценом 10 (десет) на завршном раду под називом „Одређивање физиолошких својстава нових сојева бактерија из родова *Bacillus* и *Virgibacillus*“. По завршетку основних академских студија уписала је мастер академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду школске 2017/2018. године, на истоименом студијском програму. Завршни мастер рад под називом „*In vitro* анализа трансдермалне дифузије естара витамина Ц“ одбранила је у септембру 2018. године са оценом 10 (десет), док је мастер студије завршила са просечном оценом 9,75. У току студирања остварила је укупну просечну оцену 9,47. Током основних и мастер академских студија Милица Вељковић је била стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја.

Докторске академске студије уписала је школске 2018/2019. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под менторством редовног професора др Дејана Безбрадице. Изабрана је у звање истраживач-приправник 07.03.2019. године, а од 15.03.2019. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета на пројекту

Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИИИ 46010).

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Милица Вељковић је положила све испите предвиђене планом и програмом докторских академских студија Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду са просечном оценом 9,92 укључујући и завршни испит са темом „Ензимска синтеза потврђених и потенцијалних пребиотика“.

Преглед положених испита на докторским академским студијама са оценама и ЕСПБ бодовима:

Назив предмета	Оцена	ЕСПБ
Одабрана поглавља математичке анализе	10	5
Хемијска кинетика	9	5
Биохемијска кинетика	10	5
Аналогије феномена преноса	10	5
Одабрана поглавља биохемије-витамини	10	5
Санитарна микробиологија	10	4
Биомаса као извор енергије	10	4
Биоактивне материје у козметичким производима	10	4
Индустријска микробиологија	10	5
Пројектовање биолошких процеса пречишћавања отпадних вода	10	5
Одабрана поглавља технологије микробне биомасе	10	5
Енглески језик	10	/
Завршни испит	10	30
Укупно	9,92	82

Као студент докторских академских студија Милица Вељковић је уз сагласност Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду била ангажована у настави на извођењу експерименталних вежби из предмета Општа хемија 2 (летњи семестар школске 2018/2019. године) и Биотехнолошки практикум 1 (зимски семестар школске 2019/2020., 2020/2021., 2021/2022. године). Учествовала је у експерименталном раду и обради резултата неколико завршних и мастер радова студената на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију.

У оквиру научно-истраживачког рада на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, Милица Вељковић се бавила истраживањима у области биоактивних компоненти-пребиотика. На основу досадашњих истраживања и резултата, проистекао је један рад у часопису међународног значаја (M24) и једно саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33), док је рад за публикавање у међународном часопису у припреми.

Објављени научни радови и саопштења:

Рад објављен у националном часопису од међународног значаја (M24):

1. **Veljković M.**, Modi A., Petrov A., Čorović M., Milivojević A., Banjanac K., Simović M., Bezbradica D.: *Enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using Pectinex® Ultra SP-L: a study of experimental conditions*, - Food and Feed Research, in press.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33):

2. **Veljković M.**, Petrov A., Simović M., Banjanac K., Mitrušić A., Katić K., Marinković A.: *Development of fructosyltransferase nanobiocatalyst for application in synthesis of bioactive fructo-oligosaccharides*, - Proceedings of the 7th International Congress of Engineering, Environment and Materials in Process Industry, Jahorina 2021., pp. 314-325.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија, Милица Вељковић, мастер инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Истраживање на предложеној теми докторске дисертације укључује развој микробиолошких метода за одређивање пребиотске активности и оптимизацију ензимских процеса, а кандидаткиња је стекла значајно искуство и вештине неопходне за ове експерименталне активности током израде завршног рада, мастер рада и при извођењу лабораторијских вежби на Катедри за БИБ. У области истраживања била је коаутор једног рада у националном часопису од међународног значаја (M24) и једног саопштења са међународног скупа штампано у целини (M33). На основу свега наведеног, Комисија закључује да кандидат испуњава услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је унапређење ензимске производње фрукто-олигосахарида добијањем имобилисаних препарата високе активности и стабилности, развој континуалног ензимског поступка производње у реактору са имобилисаним ензимом и сепарације производа применом мембранских техника.

Последњих деценија је биоактивним компонентама, каквим се сматрају пребиотици, посвећена велика пажња због њиховог вишеструког значаја, не само за гастроинтестинални тракт, већ и за цео организам [1]. Иако пребиотици привлаче велико интересовање научне заједнице, мали је број једињења чије је пребиотско дејство непобитно доказано у клиничким тестовима, као што су фрукто-олигосахариди (ФОС). Овај назив обухвата групу олигосахарида који се састоје од једне терминалне глукозне јединице и преосталих фруктозних јединица [2]. Обично се представљају формулом GF_n , где се G односи на молекул глукозе, а F_n на број јединица фруктозе који је у опсегу од 2-10. Установљено је да ФОС доспевају у изворном облику до дебелог црева где представљају извор хране пробиотским бактеријама чиме подстичу њихову пролиферацију и омогућавају нормално функционисање цревне микробиоте [3]. Као продукти њихове ферментације настају краткочланчане масне киселине које не само да снижавају рН средине и онемогућавају опстанак патогених врста већ остварују позитиван утицај и на ресорпцију минерала, имунски систем али и друге здравствене предности [4]. Поред бројних позитивних физиолошких ефеката, ФОС се сматрају некариогеним и нискокалоричним хемијским компонентама чији је степен сласти незнатно нижи у поређењу са сахарозом [5]. Стога, поменути пребиотици се користе као функционални заслађивачи погодни и за дијабетичаре, али и као адекватна шећерна замена у бројним производима које прехранбена индустрија нуди (сок, џем, бомбоне, колачи и друго) стварајући на тај начин производе са мањом калоријском, а већом функционалном вредношћу [5]. Природно су присутни у разном воћу и поврћу, али у малим

количинама [6] због чега се приступа њиховој синтези која је уједно и основни циљ ове дисертације. Иако се могу добити хемијским путем, најчешће се практикује употреба ензима за њихову производњу због високе специфичности ензима и избегавања употребе токсичних реагенса, стварајући на тај начин мање загађујућег отпада као и споредних производа [7]. ФОС се ензимским путем могу добити хидролизом инулина употребом инулиназа или трансформацијом сахарозе употребом фруктозил-трансфераза или β -фруктофуранозидаза искључиво у условима високих концентрација супстрата [8]. Уколико се као полазни супстрат за синтезу фрукто-олигосахарида користи сахароза, број фруктозних јединица добијених олигосахарида је најчешће од 2-4, за разлику од употребе нативног инулина када је то од 2 до 7 [9]. У оквиру ове дисертације биће разматрана ензимска синтеза поменутих олигосахарида полазећи од сахарозе као супстрата, не само због чињенице да овим путем настају олигосахариди нижег степена полимеризације за које је потврђено да поседују израженији пребиотски ефекат [10], већ и због ниже тржишне цене сахарозе у поређењу са инулином, чиме се процес сматра економски исплативијим [7]. Ова ензимска реакција проучавана је у бројним истраживањима, али ефикасност технолошког поступка може да се значајно унапреди применом свеобухватног биоинжењерског приступа који би подразумевао развој и коришћење ефикасних имобилисаних ензима као биокатализатора, примену континуалних реакторских система који би под оптималним условима омогућили интензификацију процеса ензимске синтезе и пречишћавање синтетисаних ФОС савременим сепарационим техникама у циљу добијања финалног производа високог степена чистоће.

ФОС се могу добити употребом слободних фруктозил-трансфераза, али се најчешће приступа њиховом превођењу у имобилисани облик различитим техникама имобилизације због бројних предности које се овим путем могу остварити. Овим процесом се може добити имобилисани препарат који ће имати већу оперативну стабилност, који се једноставно може уклонити из реакционе смеше и поново употребити, а и применити у континуалној реализацији процеса [2, 11, 12]. И поред тога што постоје примери успешне имобилизације микробних фруктозил-трансфераза, проналажење робустних биокатализатора, који би били погодни за употребу у широком опсегу оперативних услова, и даље представља изазов. У оквиру ове дисертације ће стога бити разматрана и оптимизација процеса имобилизације која има за циљ унапређење перформанси имобилисаног ензимског препарата добијеног различитим техникама имобилизације који се даље може потенцијално применити у различитим реакторским конфигурацијама у циљу синтезе ФОС.

Финални производ ензимске синтезе је ФОС са приносом у опсегу од 55-60% и чије је даље повећање лимитирано услед присуства знатне количине глукозе која се ослобађа као споредни производ, инхибирајући одвијање реакције трансфруктозилације [13]. Присуство глукозе али и других шећера попут фруктозе и непрореаговале сахарозе, умањује пребиотску активност, а значајно доприноси повећању калоријске вредности добијеног производа ограничавајући његову примену. Различити аутори су у циљу повећања приноса и добијања производа вишег степена пречишћености ФОС примењивали различите приступе, попут континуираног уклањања глукозе употребом ензима, као и испитивања могућности уклањања непрореаговале сахарозе и споредних производа реакције адсорпцијом, селективном ферментацијом или мембранским техникама [10, 13-15].

Циљ истраживања ове докторске дисертације је развој и оптимизација поступака синтезе ФОС и различитих фруктозил-деривата употребом слободног и имобилисаног ензима као и пречишћавање добијене смеше. У почетној фази истраживања биће изабрани најефикаснији ензими за синтезу ФОС између различитих комерцијалних ензимских препарата (Pectinex® Ultra SP-L, Viscozyme® L, Viscoflow™ и др.) и биће извршена оптимизација процеса ензимске синтезе ФОС одређивањем оптималних вредности кључних процесних фактора (pH, температура, време

реакције, концентрација супстрата и ензима). Као одзивне величине биће анализиран удео ФОС у реакционој смеши, принос ФОС и продуктивност синтезе ФОС изражена по јединици времена и масе ензима. Састав реакционе смеше у оквиру ових експеримената биће праћен методом течне хроматографије високих перформанси (HPLC) са колонама за раздвајање шећера и рефрактометријским детектором. Структура добијених производа биће додатно карактерисана течном хроматографијом високих перформанси спрегнутом са тандем масеном спектрометријом (HPLC-MS/MS) и нуклеарно-магнетно-резонантном (NMR) спектроскопијом. Биће праћена и пребиотска активност производа одговарајућим микробиолошким тестовима. Након тога, биће дефинисан кинетички модел који описује ток ензимске синтезе ФОС коришћењем различитих програмских пакета (COPASI и MATLAB), што ће омогућити боље сагледавање механизма реакције трансфруктозилације и боље управљање процесом. Биће испитана и ензимска синтеза деривата ФОС додавањем алтернативних акцептора фруктозил групе (други шећери и шећерни алкохоли) са циљем добијања нових пребиотских једињења.

У наредној фази истраживања биће изведена имобилизација ензима фруктозил-трансферазе из комерцијалних препарата на комерцијалне полиметакрилатне и полистиренске носаче употребом различитих метода имобилизације - адсорпције и ковалентне имобилизације. Ради ефикасне ковалентне имобилизације биће извршене и модификације носача увођењем различитих функционалних група. Синтеза ФОС се обично изводи у реакцији коју катализује слободан ензим у комплексним супстратима прехранбене индустрије, чиме након завршетка реакције ензим остаје у финалном производу што искључује могућност поновне употребе ензимског препарата. Имобилизација фруктозил-трансферазе има и додатну функцију. Наиме, у комерцијалним препаратима овај ензим се налази у врло малим концентрацијама, а доминирају претежно хидролитички ензими попут пектиназа, целулаза или хемицелулаза. Зато је циљ овог дела истраживања да се постигне што већа селективност имобилизације, а тиме испуни и функција делимичног пречишћавања фруктозил-трансферазе из комплексног ензимског препарата при чему би се добијени имобилисани ензим могао употребити за конверзију широког спектра воћних супстрата богатих сахарозом без нежељених промена функционалних својстава производа деловањем хидролитичке активности нпр. пектиназа. Као носачи за имобилизацију биће примењене и наночестице силике јер наноматеријали, због велике специфичне површине и погодних механичких карактеристика, представљају погодне носаче за имобилизацију. Избор најбољих имобилисаних ензима биће изведен на основу одређивања активности фруктозил-трансферазе, пектиназе и целулазе стандардним спектрофотометријским методама, активности у реакцији синтезе ФОС и праћењем стабилности имобилисаног ензима.

У наредној фази истраживања, најбољи имобилисани препарати биће употребљени за синтезу ФОС у различитим реакторским системима (шаржни реактор са мешањем и пнеуматски реактор). Биће постављени кинетички модели реакције синтезе ФОС у овим реакторима на основу претходних сазнања о механизму реакције из експеримената са слободним ензимом и биће оптимизовани оперативни услови. Након оптимизације у шаржном режиму рада, пнеуматски реактор са имобилисаним ензимом биће примењен за развијање континуалног процеса производње ФОС.

У завршној фази истраживања биће оптимизовано пречишћавање ФОС са аспекта степена чистоће и приноса пречишћавања. Реакцијом трансфруктозилације настаје смеша која садржи у највећој количини ФОС различитих степена полимеризације, затим глукозу и фруктозу као споредне производе реакције и непрореаговалу сахарозу. Биће примењена два приступа сепарације ФОС – селективна ферментација споредних производа и нанофилтрација. У циљу оптимизације процеса пречишћавања, биће испитан утицај кључних радних параметара – врсте микроорганизма код селективне ферментације и температуре, протока, почетне концентрације

напојне смеше и начина извођења самог процеса (шаржни поступак или дијафилтрација) код нанофилтрације.

Последњих година објављени су резултати бројних истраживања која се, из различитих аспеката, баве проблематиком производње пребиотика. У даљем тексту наведени су само најважнији који представљају основу за истраживања у оквиру ове докторске дисертације:

- [1] Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Masoumi S.J., Berenjian A., Ghasemi Y.: *Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications*, - Foods, Vol 8, No 3, 2019, pp. 1-27.
- [2] Flores-Maltos D. A., Mussatto S. I., Contreras-Esquivel J. C., Rodríguez-Herrera R., Teixeira J. A., Aguilar C. N.: *Biotechnological production and application of fructooligosaccharides*, -Critical Reviews in Biotechnology, Vol 36, No 2, 2016, pp. 259-267.
- [3] Hernandez Ortega J., Severino P.: *Development of Probiotics and Prebiotics*, -Engineering Aspects of Food Biotechnology, 2013, pp. 21-60.
- [4] Ashwini A., Ramya H.N., Ramkumar C., Reddy K.R., Kulkarni R.V., Abinaya V., Naveen S., Raghu A.V.: *Reactive mechanism and the applications of bioactive prebiotics for human health: Review*, - Journal of Microbiological Methods, Vol 159, 2019, pp. 128-137.
- [5] Bali V., Panesar P. S., Bera M. B., Panesar R.: *Fructo-oligosaccharides: Production, Purification and Potential Applications*, - Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol 55, 2015, pp. 1475–1490.
- [6] Sridevi, V., Sumathi, V., Guro Prasad M., Murari, S. K.: *Fructooligosaccharides - type prebiotic : A Review*, - Journal of Pharmacy Research, Vol 8, No 3, 2014, pp. 321–330.
- [7] Sánchez-Martínez M. J., Soto-Jover S., Antolinos V., Martínez-Hernández G. B., López-Gómez A.: *Manufacturing of Short-Chain Fructooligosaccharides: from Laboratory to Industrial Scale*, - Food Engineering Reviews, Vol 12, No 2, 2020, pp. 149–172.
- [8] Maiorano A. E., Piccoli R. M., Da Silva E. S., De Andrade Rodrigues M. F.: *Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics*, -Biotechnology Letters, Vol 30, No 11, 2008, pp. 1867–1877.
- [9] Contesini F. J., de Lima E. A., Mandelli F., Borin G. P., Alves R. F., Terrasan C. R. F.: *Carbohydrate active enzymes applied in the production of functional oligosaccharides*, - Encyclopedia of Food Chemistry, 2018, pp. 30-34.
- [10] Martins G. N., Ureta M. M., Tymczynszyn E. E., Castilho P. C., Gomez-Zavaglia A.: *Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. Enzymatic synthesis and hydrolysis*, -Frontiers in Nutrition, Vol 6, 2019, pp. 78-102.
- [11] Homaei A. A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R.: *Enzyme immobilization: an update*, -Journal of Chemical Biology, Vol 6, 2013, pp. 185-205.
- [12] Ureta M.M., Martins G.N., Figueira O., Pires P.F., Castilho P.C., Gomez-Zavaglia A.: *Recent advances in β -galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology*, -Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol 61, No 16, 2021, pp. 2659-2690.
- [13] Nobre C., Teixeira J.A., Rodrigues L.R.: *New Trends and Technological Challenges in the Industrial Production and Purification of Fructo-oligosaccharides*, -Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol 55, No 10, 2015, pp. 1444-1455.
- [14] Rong F., Philipp B.J., Jinqing H., Tao X., Peter C.: *Purification of Crude Fructo-Oligosaccharide Preparations Using Probiotic Bacteria for the Selective Fermentation of Monosaccharide Byproducts*, -Frontiers in Microbiology, Vol 11, 2021, pp. 3635.
- [15] Li J., Chase H.A.: *Applications of membrane techniques for purification of natural products*, - Biotechnology Letters, Vol 32, 2010, pp. 601–608.

3. Полазне хипотезе

Повећана свест о вишеструким благотворним ефектима функционалне хране, а пре свега пребиотика, на људско здравље, узроковала је велики број истраживања у области проналажења нових пребиотских једињења, као и развоја нових технолошких поступака њиховог добијања и оптимизације ових процеса. Број научних публикација о пребиотицима бележи убрзан раст у последњих неколико година који је у највећој мери последица интензивног проучавања нових пребиотика. Са аспекта поузданости физиолошког дејства, пребиотици се деле на две велике групе: потврђене пребиотике, чије пребиотско дејство је доказано клиничким тестовима и потенцијалне пребиотике, на чије пребиотско дејство указују *in vitro* микробиолошки тестови и/или тестови на животињама. Потенцијални пребиотици су предмет интензивних истраживања која су, у овим почетним фазама, углавном усмерена ка микробиолошким анализама и карактеризацији хемијске структуре. Научна истраживања потврђених пребиотика, у које се сврставају и ФОС, померају се из области микробиологије и хемије ка истраживањима у области технолошког инжењерства, пошто су хемијске структуре и активности ових пребиотика потврђене. Зато је данас највећи изазов да се њихова производња учини ефикаснијом и економичнијом чиме се може повећати обим њихове примене у прехранбеним производима и ефекат на здравље популације. Технолошки поступци за производњу ФОС могу се значајно унапредити применом знања из области биохемијског инжењерства. Добијањем имобилисаних ензима повећане активности и стабилности може се унапредити искоришћење каталитичке активности ензима. Избором погодног биореактора са имобилисаним ензимима и развијањем континуалних процеса може се повећати продуктивност процеса производње ФОС, а ефикаснијим сепарационим процесима степен пречишћености производа.

Узевши у обзир све претходно наведено, хипотезе које се могу издвојити као полазна основа за започињање научно-истраживачког рада у оквиру ове дисертације су следеће:

- За унапређење технолошких поступака синтезе ФОС неопходно је боље искоришћење каталитичког потенцијала фруктозил-трансферазе и познавање механизма реакције трансфруктозилације. Из тог разлога ће у почетном делу истраживања бити одабран најефикаснији ензимски препарат између неколико комерцијалних препарата који поседују фруктозил-трансферазну активност и биће оптимизовани најважнији фактори ензимске реакције синтезе ФОС применом статистичких метода планирања експеримента и методе одзивних површина. Биће дефинисан и кинетички модел ензимске реакције који најбоље описује ток реакције и одређене кинетичке константе модела, што ће омогућити сагледавање механизма реакције. Такође, биће праћене и промене степена полимеризације ФОС у току реакције и анализиран утицај степена полимеризације на пребиотску активност да би се реакција оптимизовала и из аспекта постизања максималне физиолошке активности производа.
- Ензимска активност фруктозил-трансферазе може да се искористи и за добијање нових физиолошки активних једињења применом алтернативних фруктозил-акцептора. У оквиру ове дисертације биће испитана могућност синтезе нових једињења применом различитих шећера, шећерних алкохола и флавоноида као акцептора и биће анализирана пребиотска активност свих једињења која дају високе приносе синтезе.
- Добијање нових имобилисаних фруктозил-трансфераза високе активности и стабилности омогућава продужену или поновљену употребу ензим, али имобилизација може имати и додатну функцију пречишћавања ензима пошто се у комерцијалним препаратима овај ензим налази у сложеним смешама у којима доминирају други ензими (пектиназе, целулазе и хемицелулазе). Зато ће се при оптимизацији имобилизације поред стандардних параметара (имобилисане активности и приноса имобилизације) анализирати и однос имобилисане активности фруктозил-трансферазе и пектинолитичке активности као

индикатор селективности имобилизације и ефикасности пречишћавања циљаног ензима. У почетном делу овог истраживања биће анализирана имобилизација ензима адсорпцијом на комерцијалне аминокиселино-функционализоване полистиренске и полиметакрилатне носаче, а након тога ће бити истражена ковалентна имобилизација након хемијске модификације носача и/или ензима ради увођења реактивних функционалних група (карбонилне или оксиданске). Надаље, биће анализирана и ефикасност нанобиокатализатора у реакцији синтезе ФОС пошто ће фруктозил-трансфераза бити имобилисана на наносилику и наносилику функционализовану аминокиселином, оксиданским или фенил групама.

- Продуктивност ензимских процеса за производњу ФОС и конкурентност овог производа на тржишту додатака храни може драстично да се повећа развојем континуалних поступака. Зато ће имобилисани ензими који покажу највећу активност и стабилност бити примењени у проточном биореактору са пневматском циркулацијом (gas-lift реактор). Оперативни услови биће оптимизовани у експериментима у шаржном режиму рада, а након тога ће бити изведени експерименти у континуалном режиму ради евалуације оперативне стабилности проточног биореактора са имобилисаним ензимом. Такође, у оквиру развијања континуалних процеса за синтезу ФОС, биће испробана и употреба мембранских реактора, како са слободним, тако и са имобилисаним ензимским препаратом. Уколико буде доказана ефикасност примене мембранског реактора у синтези ФОС, овај приступ ће омогућити развој хибридног поступка за добијање финалног производа високог степена пречишћености.
- Завршни део дисертације биће посвећен унапређењу процеса пречишћавања ФОС након ензимске синтезе применом селективне ферментације и мембранских техника. У истраживањима посвећеним сепарацији помоћу селективне ферментације биће анализирано више бактерија и квасаца са циљем да се одаберу они који ферментишу само споредне производе и непрореаговалу сахарозу, а не ферментишу ФОС. Посебна пажња биће посвећена примени мембранских технологија у пречишћавању ФОС, имајући у виду бројне предности попут високе ефикасности, једноставне опреме, ниске потрошње енергије и мануелног рада. Биће примењени мембрански модули за нанофилтрацију за које су карактеристичне погодне величине пора, на основу номиналних коефицијената одбијања, за раздвајање трисахарида и виших олигосахарида од ди- и моносахарида. У циљу потпунијег пречишћавања ФОС сепарација ће бити изведена у режиму дијалитрације.

4. Научне методе истраживања

Ензимска активност различитих комерцијалних препарата биће анализирана стандардним спектрофотометријским методама за одређивање активности фруктозил-трансфераза, пектиназа и целулаза. Концентрација ФОС биће одређена применом течне хроматографије високих перформанси са рефрактометријским детектором, а биће примењиване две колоне за раздвајање шећера: колона са аминокиселинским групама (Hypersil™ APS-2, 250 mm × 4 mm, 5μm) и колона са Ca²⁺ јонима у којој се шећери раздвајају према афинитету за формирање хелатног комплекса (Hi-Plex Ca, 300 × 7.7 mm). Карактеризација олигосахарида са аспекта степена полимеризације и типа гликозидне везе биће изведена помоћу течне хроматографије високих перформанси спрегнуте са тандем масеном спектроскопијом (HPLC-MS/MS) и NMR спектроскопије. Пребиотска активност биће одређена микробиолошким тестовима заснованим на праћењу раста појединачних одабраних представника цревне микробиоте. Оптимизација реакционих фактора биће изведена статистичким методама планирања експеримента и методом одзивних површина, а за статистичку анализу и интерпретацију добијених резултата биће коришћени софтверски

пакети Stat Ease Design Expert и MATLAB. Имобилизација фруктозил-трансфераза на различите носаче биће извршена применом различитих техника хемијске модификације, а приликом карактеризације имобилисаних ензимских препарата, биће коришћена ФТИР спектроскопска анализа и електронска микроскопија. Најбољи имобилисани препарати биће примењени у различитим реакторским системима у шаршним условима рада, а континуална синтеза производа биће изведена у пнеуматском реактору са унутрашњом циркулацијом течне фазе, а ваздух ће бити коришћен као гасна фаза. Пречишћавање селективном ферментацијом биће изведено у микроаерофилним условима коришћењем финалне реакционе смеше као хранљиве подлоге за раст тестираних микроорганизама. Пречишћавање реакционе смеше нанофилтрацијом биће изведено помоћу апаратуре која се састоји од мембранске пумпе, регулационог вентила и кућишта за спиралне мембранске моделе. Биће коришћени мембрански модули за нанофилтрацију дужине 30 cm и унутрашњег пречника 4,8 cm различитих димензија пора (MWCO 600-800 Da и MWCO 500-700 Da).

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос унапређењу постојећих и развоју нових технолошких поступака за добијање фрукто-олигосахарида. У оквиру истраживања може се очекивати неколико основних доприноса:

- Биће развијени оригинални поступци за производњу фрукто-олигосахарида и њихових деривата, што подразумева неколико појединачних доприноса:
 - биће оптимизовани услови ензимског трансфруктозиловања сахарозе,
 - биће дефинисан кинетички модел ензимске синтезе ФОС чиме ће се дати допринос расветљању механизма реакције,
 - биће успостављена корелација између структуре ФОС и пребиотске активности,
 - биће одређен утицај фруктозил-акцептора (шећера, шећерних алкохола или флавоноида) на ефикасност синтезе фруктозил деривата и пребиотска активност нових производа.
- Биће развијени нови имобилисани препарати фруктозил-трансферазе, што подразумева неколико појединачних доприноса:
 - биће развијени поступци селективне имобилизације фруктозил-трансферазе који ће омогућити истовремену имобилизацију и пречишћавање овог ензима,
 - биће оптимизовани поступци хемијске модификације носача и ензима и биће добијене ковалентно имобилисане фруктозил-трансферазе,
 - биће оптимизовани услови имобилизације овог ензима адсорпцијом,
 - биће развијени нови нанобиокатализатори који имају активност фруктозил-трансферазе.
- Биће развијени нови технолошки поступци производње ФОС и сепарације финалног производа, што подразумева следеће доприносе:
 - биће развијени нови процеси у биореакторима са имобилисаним фруктозил-трансферазама у шаржном режиму рада,
 - биће развијени континуални процеси са имобилисаним ензимима у биореактору са пнеуматском циркулацијом,
 - биће развијене нове методе пречишћавања ФОС засноване на примени мембранских техника (нанофилтрација) и/или селективне ферментације споредних производа и непрореаговалог супстрата.

6. План истраживања и структура рада

Циљеви истраживања ове докторске дисертације су развој нових имобилисаних производних ензима, развој и оптимизација поступака синтезе ФОС и фруктозил-деривата и развој нових метода пречишћавања финалног производа.

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

У поглављу *Увод* биће дефинисани основни циљеви и предмет истраживања, као и допринос дисертације.

Теоријски део докторске дисертације обухватиће преглед и анализу доступне литературе која се односи на:

- Дефиницију, класификацију и физиолошко дејство пребиотика,
- Хемијску структуру и примену ФОС,
- Ензимску синтезу пребиотика,
- Технике и носаче за имобилизацију ензима,
- Имобилизацију фруктозил-трансфераза,
- Биореакторе са имобилисаним ензимима.
- Методе за пречишћавање ФОС

У *Експерименталном делу* биће наведени употребљени материјали и описане примењене методе, конкретније:

- Хемикалије и материјали употребљени у раду,
- Методе за одређивање пребиотске активности,
- Услови ензимске синтезе ФОС,
- Методе за одређивање концентрације ФОС,
- Методе за имобилизацију ензима,
- Инструменталне методе за одређивање структуре ФОС,
- Методе за пречишћавање производа мембранским техникама и селективном ферментацијом,
- Услови ензимске синтезе ФОС у реакторима са имобилисаним ензимима.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће представљени и дискутовани резултати ензимске синтезе ФОС, имобилизације ензима на макропорозне носаче и наносилику, оптимизације рада биореактора са имобилисаним ензимима у шаржном и континуалном режиму рада и пречишћавања ФОС.

У *Закључку* ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз стављање акцента на њихове научне доприносе, иновативност и будућу примену.

Литература ће садржати литературне наводе цитиране у дисертацији и публикације проистекле из истраживачког рада у оквиру ове дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу података о досадашњем раду и постигнутим резултатима, Комисија сматра да кандидат Милица Вељковић, мастер инжењер технологије, испуњава све услове са рад на предложеној докторској дисертацији под насловом „Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида“. Комисија сматра да је тема докторске дисертације научно заснована и да ће представљати значајан допринос у 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 кандидату Миlici Вељковић одобри

израду ове докторске дисертације. За ментора докторске дисертације Комисија предлаже др Дејана Безбрадицу, редовног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 16.12.2021.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

.....
Др Мирјана Рајилић-Стојановић
Доцент
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Милица Симовић
Научни сарадник
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Мирјана Антов
Редовни професор
Универзитет у Новом Саду,
Технолошки факултет

.....
Др Дарко Јаћимовски
Научни сарадник
Институт за хемију, технологију
и металургију, Београд