

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/329

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

12.1.2023.

(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:

**Имобилисане протеазе и пероксидазе на магнетним микронским и субмикронским
честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и
разградњу антрахинонских боја из отпадних вода**

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Марко (Милорад) Јонових

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

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Основне студије, Дипломирани инжењер технологије

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2013.

4. Година уписа на докторске студије: 2022.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Хемијско инжењерство

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ 1 :

Име и презиме ментора: др Бранко Бугарски

Звање: редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитет у Београду

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Volić, M.; Pajić-Lijaković, I.; Djordjević, V.; Knežević-Jugović, Z.; Pećinar, I.; Stevanović-Dajić, Z.; Veljović, Đ.; Hadnadjev, M.; **Bugarski, B.** Alginate/Soy Protein System for Essential Oil Encapsulation with Intestinal Delivery. *Carbohydr Polym* **2018**, *200* (November), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.033>. IF(6.044), ISSN: 144-8617
2. Stefanović, A. B.; Jovanović, J. R.; Dojčinović, M. B.; Lević, S. M.; Nedović, V. A.; **Bugarski, B. M.**; Knežević-Jugović, Z. D. Effect of the Controlled High-Intensity Ultrasound on Improving Functionality and Structural Changes of Egg White Proteins. *Food Bioproc Tech* **2017**, *10* (7), 1224–1239. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1884-5>. IF(2.998), ISSN: 1935-5130
3. Žuža, M.; Milašinović, N.; Jonović, M.; Jovanović, J.; Kalagasidis-Krušić, M.; **Bugarski, B.**; Knežević-Jugović, Z. Design and Characterization of Alcalase–Chitosan Conjugates as Potential Biocatalysts. *Bioprocess Biosyst. Eng* **2017**, *40*(11), 1713–1723. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1826-7>, IF(2.139), ISSN: 1615-7591
4. Pajić-Lijaković, I.; Levic, S.; Hadnadjev, M.; Stevanović-Dajić, Z.; Radosevic, R.; Nedovic, V.; **Bugarski, B.** Structural Changes of Ca-Alginate Beads Caused by Immobilized Yeast Cell Growth. *Biochem Eng J* **2015**, *103*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.06.016>. IF(2.463), ISSN:1369-703X
5. Levic, S.; Djordjevic, V.; Rajic, N.; Milivojevic, M.; **Bugarski, B.**; Nedovic, V. Entrapment of Ethyl Vanillin in Calcium Alginate and Calcium Alginate/Poly(Vinyl Alcohol) Beads. *Chemical Papers* **2013**, *67* (2), 221–228. <https://doi.org/10.2478/s11696-012-0260-1>. IF(1.193), ISSN: 0366-6352

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ 2:

Име и презиме ментора: др Зорица Кнежевић Југовић

Звање: редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитет у Београду

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Milašinović, N.; **Knežević-Jugović, Z.**; Jakovljević, Ž.; Filipović, J.; Kalagasidis Krušić, M. Synthesis of N-Amyl Isobutyrate Catalyzed by Candida Rugosa Lipase Immobilized into Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-Itaconic Acid) Hydrogels. *Chemical Engineering Journal* **2012**, 181–182, 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.11.115>. IF(4.058); ISSN:1385-8947.
2. Jakovetić-Tanasković, S.; Jokić, B.; Grbavčić, S.; Drvenica, I.; Prlainović, N.; Luković, N.; **Knežević-Jugović, Z.** Immobilization of Candida Antarctica Lipase B on Kaolin and Its Application in Synthesis of Lipophilic Antioxidants. *Appl Clay Sci* **2017**, 135, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.09.011>. IF(3.641); ISSN:0169-1317.
3. 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* **2016**, 68 (5–6), 427–435. <https://doi.org/10.1002/star.201500161>. IF(2.173), ISSN:0038-9056.
4. Šekuljica, N. Ž.; Prlainović, N. Ž.; Jovanović, J. R.; Stefanović, A. B.; Đokić, V. R.; Mijin, D. Ž.; **Knežević-Jugović, Z. D.** Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Kaolin. *Bioprocess Biosyst Eng* **2016**, 39 (3), 461–472. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1529-x>. IF(1.901); ISSN:1615-7591.
5. Šekuljica, N. Ž.; Jovanović, J. R.; Jakovetić Tanasković, S. M.; Ognjanović, N. D.; Gazikalović, I. v.; **Knežević-Jugović, Z. D.**; Mijin, D. Ž. Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Purolite® A109 and Its Anthraquinone Dye Biodegradation and Detoxification Potential. *Biotechnol Prog* **2020**, 36 (4), e2991. <https://doi.org/10.1002/btpr.2991>. IF(2.334) ISSN:8756-7938.

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 29.12.2022. 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 **Марка Јоновиха**, број индекса 4024/22, под називом: **„Имобилицане протеазе и пероксидазе на магнетним микронским и субмикронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода“**.

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

За менторе се одређују др Бранко Бугарски, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Одлуку доставити: Универзитету у Београду, кандидату, менторима, 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 **Марка (Милорад) Јоновиха, дипл. инж. технол.** за израду докторске дисертације

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета бр.35/270 од 22.11.2022. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата **Марка (Милорад) Јоновиха, дипл. инж. технол.** за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом:

„Имобилисане протеазе и пероксидазе на магнетним микронским и субмикронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода“

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Марко М. Јонових, дипл. инж. технологије, рођен је 26.06.1986. године у Зајечару. У Бору је завршио гимназију „Бора Станковић“. Дипломирао је на Технолошко-металуршком факултету у Београду, на катедри за Органску хемијску технологију и полимерно инжењерство. Дипломски рад по називу „Екстракција угљен (IV)-оксидом из матичњака (*Melissa officinalis*) - кинетика процеса и математичко моделовање“ одбранио је 27.09.2013. године.

Докторске студије - студијски програм: Хемијско инжењерство уписао је на Технолошко-металуршком факултету, Универзитет у Београду школске 2013/2014. године. На докторским студијама се бави имобилисаним ензима и њиховим употребом у индустрији, медицини и козметици. Испите предвиђене планом и програмом докторских студија положио је са просечним оценом 9.67 (девет и 67/100) и одбранио завршни испит под називом „Имобилизација протеолитичких ензима на различите носаче“.

1.2. Сечено научно-истраживачко искуство

Од 01.11.2013. запослен је у Центру за електрохемију, Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду, као истраживач приправник, а од 02.02.2015. као истраживач сарадник. У протеклом периоду био је ангажован на пројекту Министарства просвете и науке Републике Србије: ТР-37001 „Утицај рударског отпада из РТБ-а Бор на загађење водотока са предлогом мера и поступака за смањење штетних

утицаја на животну средину“, период 2011-2019, чији је руководилац био Др. Миле Бугарин.

Списак предмета положених на докторским студијама

Предмет	ЕСПБ	Оцена
1. Одабрана поглавља математичке анализе	5	10
2. Аналогије феномена преноса	5	8
3. Специјална поглавља преноса масе	4	9
4. Виши курс термодинамике	5	10
5. Биомаса као извор енергије	4	10
6. Хемијска кинетика	5	9
7. Одабрана поглавља хемије природних органских једињења	4	10
8. Хемија физиолошки активних једињења	5	10
9. Анализа рада и пројектовање вишефазних хемијских реактора	5	10
10. Хетерогена катализа	4	10
11. Енглески језик	/	10
12. Биохемијска кинетика	5	10
13. Завршни испит	30	10
Збир ЕСПБ поена – 81	Просечна оцена 9.67	

Списак објављених научних радова и саопштења

M21 – Рад у врхунском међународном часопису:

(1) **Jonović, M.**; Jugović, B.; Žuža, M.; Đorđević, V.; Milašinović, N.; Bugarski, B.; Knežević-Jugović, Z. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Magnetite-Alginate Beads to Enable Effective Strong Binding and Enzyme Recycling during Anthraquinone Dyes' Degradation. Polymers 2022, 14, 2614, **IF(5.063)**, **ISSN: 2073-4360**, <https://doi.org/10.3390/polym14132614>

M22 – Рад у међународном часопису:

(2) Žuža, M.; Milašinović, N.; **Jonović, M.**; Jovanović, J.; Kalagasidis-Krušić, M.; Bugarski, B.; Knežević-Jugović, Z. Design and Characterization of Alcalase–Chitosan Conjugates as Potential Biocatalysts. Bioprocess Biosyst. Eng. 2017, 40 (11), 1713-1723, **IF(2.139)**, **ISSN: 1615-7591**, <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1826-7>

(3) **Jonović, M.**; Žuža, M.; Đorđević, V.; Šekuljica, N.; Milivojević, M.; Jugović, B.; Bugarski, B.; Knežević-Jugović, Z. Immobilized Alcalase on Micron- and Submicron-Sized Alginate Beads as a Potential Biocatalyst for Hydrolysis of Food Proteins, Catalysts, 2021, 11, 305, **IF(4.641)**, **ISSN: 2073-4344**, <https://doi.org/10.3390/catal11030305>

M24 – Рад у часопису међународног значаја верификованог посебном одлуком:

- (4) Avramović, Lj.; Bugarin, M.; Stevanović, Z.; Obradović, Lj.; **Jonović, M.**; Jonović, R.; Marković, R. Uticaj Rudničkog Otpada Iz RTB Bor Na Okolne Vodotokove. Zaštita Materijala, 2013, 54 (1), 83-86, ISSN: 0351-9465, <http://idk.org.rs/wp-content/uploads/2013/12/14LJILJANA.pdf>
- (5) Jonović, R.; Avramović, Lj.; Bugarin, M.; Marković, R.; Stevanović, Z.; **Jonović, M.** Proces Luženja Bakra Iz Rudarskog Otpada Sa Otpadnim Vodama. Zaštita Materijala. 2013, 54 (2), 179-182, ISSN: 0351-9465, <http://eprints.ugd.edu.mk/6927/1/ZM2-2013.pdf>
- (6) Jonović, R.; Avramović, Lj.; Stevanović, Z.; **Jonović, M.** Technological Investigations of Sulphide Oxidation From Flotation Tailings in Order to Increase the Degree of Copper Leaching. Min. Metall. Eng. Bor 2014, 6 (3), 153-160, ISSN: 1451-0162, <https://doi.org/10.5937/mmeb1403153j>
- (7) Avramović, Lj.; Stevanović, Z.; Bugarin, M.; Jonović, R.; Marković, R.; Gardić, V.; **Jonović, M.**; Đorđević, J. Characterization of Soil in the Coastal Area of the Bor River. Zaštita Mater. 2016, 57 (3), 378-382, ISSN: 0351-9465, <https://doi.org/10.5937/zasmat1603378a>
- M33** – Саопштење са међународног скупа штампано у целини:
- (8) Avramović, Lj.; Bugarin, M.; Marković, R.; Stevanović, J.; **Jonović, M.** Leaching of Flotation Tailings. In: 18th International Research Expert Conference, Trends in the Development of Machinery and Associated Technology, TMT 2014, Budapest, Hungary, 2014, pp 481-484, ISSN: 1840-4944
- (9) Jonović, R.; Bugarin, M.; Avramović, Lj.; Stevanović, Z.; **Jonović, M.** The Methods of Oxidation of Sulphide Form of Copper from Flotation Tailings. In: 18th International Research Expert Conference, Trends in the Development of Machinery and Associated Technology, TMT 2014, Budapest, Hungary, 2014; pp 485-488 ISSN: 1840-4944
- (10) Avramović, Lj.; Jonović, R.; Bugarin, M.; Stevanović, J.; Gardić, V.; Marković, R.; **Jonović, M.** Phisico-Chemical Characterization of Soil Contaminated By Mining Waste in the Valley of the Bor River. In: The 47th International October Conference on Mining and Metallurgy; Bor Lake, Bor, Serbia, 2015, pp 449-458, ISBN: 978-86-7827-047-5
- (11) Jonović, R.; Stevanović, Z.; **Jonović, M.**; Avramović, Lj. The Influence of Polluted Environmental of the Bor Region on the Quality of Plants. In: The 47th International October Conference on Mining and Metallurgy; Bor Lake, Bor, Serbia, 2015, pp 455-458, ISBN: 978-86-7827-047-5
- (12) Pantović, M.; Stević, Z.; Rajčić-Vujasinović, M.; Antić, D.; Košević, M.; Šekularac, G.; **Jonović, M.** Computer System for Electrochemical Investigations of Materials. In: The 47th International October Conference on Mining and Metallurgy; Bor Lake, Bor, Serbia, 2015, pp 523-528, ISBN: 978-86-7827-047-5
- (13) **Jonović, M.**; Žuža, M.; Đorđević, V.; Milivojević, M.; Bugarski, B.; Knežević-Jugović, Z. Hydrolysis of the Egg White and Soy Proteins by the Alcalase-Alginate-EE

Biocatalyst. In: 46th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare; Bratislava, Slovakia, 2019, pp 51-59, **ISSN: 0366-6352**

(14) Žuža, M.; Milašinović, N.; **Jonović, M.**; Kalagasidis-Krušić, M.; Knežević-Jugović, Z. Immobilization of the Alcalase onto Chitosan / TPP Beads Obtained by Inverse Emulsion Technique. In: 46th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare; Bratislava, Slovakia, 2019, pp 60–66, **ISSN: 0366-6352**

(15) Avramović, Lj.; Jonović, R.; Trifunović, V.; Gardić, V.; Dimitrijević, S.; **Jonović, M.**; Haga, K. Treatment of Flotation Tailing Using High Pressure Leaching and Solvent Extraction Process. In: 51st International October Conference on Mining and Metallurgy; Bor Lake, Bor, Serbia, 2019, pp 175-178, **ISBN: 978-86-6305-101-0**

(16) Trifunović, V.; Avramović, Lj.; Jonović, R.; Milić, S.; Đorđievski, S.; **Jonović, M.** Hydrometallurgical Treatment of Electric Arc Furnace Dust in Aim of Zinc Separation. In: 52nd International October Conference on Mining and Metallurgy; Bor Lake, Bor, Serbia, 2021; Vol. 52, pp 209-212, **ISBN: 978-86-6305-119-5**

M34 – Саопштење са међународног скупа штампано у изводу:

(17) **Jonović, M.**; Žuža, M.; Knežević-Jugović, Z.; Bugarski, B. Optimization of Alcalase Immobilization on the Alginate Beads Obtained by Electrostatic Extrusion. In: BioTech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition; Prague, Czech Republic, 2017, pp 179-180, **ISBN 978-80-7080-989-1**

M94 – Патент на националном нивоу:

(18) Milivojević, M.; Žuža, M.; **Jonović, M.**; Luković, N.; Bugarski, B.; Knežević-Jugović, Z. Calcium-Alginate Nanoparticles Produced by Ultrasonic Spray Atomization as a Carrier for Enzyme Immobilization. 2018/11014, 2018

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

У свом досадашњем раду кандидат Марко (Милорад) Јонових, дипл. инж. технол., постигао је значајне резултате и показао висок степен самосталности и способности за тимски научно-истраживачки рад. Положио је све испите на докторским студијама, као и завршни испит везан за тему дисертације. Први коаутор је једног рада M21 и једног рада M22, по једног саопштења са међународне конференције у категоријама M33 и M34, везаних за област предложене теме. Као коаутор, до сада је учествовао у изради и објављивању једног патента на националном нивоу M94, једног рада M22, два саопштења са међународне конференције штампаних као целина M33. На основу изложеног, Комисија сматра да је Марко (Милорад) Јонових, дипл. инж. технол., испунио све услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

2.1. Предмет истраживања

Предмет истраживања је имобилизација два индустријски важна ензима и то протеазе из *Bacillus licheniformis* (комерцијални назив алкалаза) и пероксидазе из рена и њихова примена у хидролизис протеина и уклањању загађујућих материја као што су феноли и синтетичке боје из отпадних вода. Фокус је на развоју техника за добијање

хидрогел честица на бази алгината и алгинат/магнетита као и техника имобилизације ензима које би омогућиле добијање биокатализатора са унапређеним каталитичким својствима. Ензимска хидролиза протеина и оксидо-редукција антрахинонских боја катализоване ензимима из различитих група одабране су као две модел реакције за испитивање каталитичких својстава имобилисаних биокатализатора због индустријске важност у индустрији хране и у процесима третирања отпадних вода из текстилне индустрије.

Развојем имобилисаних ензима омогућена је примена ензима и у оним областима када је примена слободног ензима ограничена због мале стабилности услед деградације аутокатализом, као код протеаза у случају хидролизе протеина, или услед инхибиције супстратом у вишку, као код пероксидаза за разградњу антрахинонских боја у присуству водоник-пероксида. Иmobилизацијом ензима могу се добити стабилни биокатализатори који се могу издвојити из реакционе смеше по завршетку реакције филтрацијом или центрифугирањем и користити више пута у шаржним или у току дужег временског периода у континуалним процесима. Један од најважнијих фактора имобилизације ензима је избор и дизајн носача за имобилизацију, јер физичке и хемијске карактеристике носача у великој мери одређују активност имобилисаног ензима. Носач треба да има такав хемијски састав да показује велики афинитет према ензиму омогућавајући му везивање под благим условима, или физичком адсорпцијом или хемијским ковалентним везивањем, који неће довести до његове денатурације. Данас је захваљујући примени савремених техника могуће синтетисати, окарактерисати и врло прецизно модификовати честице носача у циљу добијања носача побољшаних перформанси за имобилизацију ензима. Исто тако, на основу познавања структуре ензима, садржаја и положаја одређених хемијских група у молекулу, преко којих се жели остварити везивање са носачем, могуће је површину честица циљано хемијски модификовати да би се ензим везао преко селекованих група и тиме добио активнији и стабилнији биокатализатор. Овој области се у свету већ неколико деценија посвећује велика пажња и објављује велики број радова, који се баве утицајем врсте и величина честица носача на имобилизацију ензима, на каталитичку активност, стабилност биокатализатора, али и тумачењем типа успостављених интеракција између ензима и носача.

У овој дисертацији испитаће се могућност коришћења алгинатних честица и магнетних честица обложених алгинатом као носача за имобилизацију алкалазе и пероксидазе из рена. Неоргански носачи попут оксида гвожђа могу имати предности у поређењу са другим материјалима због велике термичке и механичке отпорности, смањене микробиолошке контаминације и магнетних својстава што је, нарочито, значајно код имобилисаних ензима, где се као основна предност у односу на нативне ензиме истиче олакшана сепарација из реакционе смеше и њихова поновна употреба. Међутим, због малог броја функционалних група на овим неорганским носачима не може се везати довољна количина ензима, нити наградити повољно микроокружење за ензим, што би довело до унапређења његових каталитичких својстава. Зато се облагањем магнетних честица додатном превлаком од неког органског полимера са већим бројем функционалних група, као што је алгинат, потенцијално може везати већа количина ензима и постићи побољшано везивање. Алгинат је природни полимер који се највише користи за имобилизацију ензима због његове нетоксичности и благих услова који се користе при имобилизацији, па је изузетно повољан за облагање магнетних честица јер обезбеђује превазилажење претходно наведених проблема.

У случају примене хидрогел честица за имобилизацију ензима, изузетно су важне њихове дифузионе карактеристике, које зависе од величине честица као и

величине и расподеле пора. Величина и сферичност алгинатних честица зависе од састава алгината, примењене технике и услова за њихово добијање. Веома је важно да се добију честице, не само оптималних пречника, већ и са униформном расподелом величина. Честице неуниформних величина нису погодне за испитивања као ни за практичну примену. Постоји више поступака за добијање алгинатних честица од врло једноставног поступка укапавања смеше алгината и биокатализатора под утицајем само гравитационих сила, па до врло сложених поступака код којих се капи формирају под утицајем додатних вибрационих, центрифугалних или електростатичких сила. Велику могућност примене за добијање честица малих пречника униформних величина у индустријским размерама има техника добијања честица под утицајем електричног поља, која се у литератури често назива електростатичка екструзија и која се заснива на примени електростатичке силе на суспензију полимера и биокатализатора која се појављује на врху игле у виду капи, при чему долази до цепања капи на више наелектрисаних ситних капљица. Ова техника је доста проучена за имобилизацију различитих биокатализатора. Међутим, у овој дисертацији испитаће се и нови поступак за добијање алгинатних субмикронских честица који се заснива на комбиновању ултразвучног распршивања, сушења топлим ваздухом и желирања у колони са оквашеним зидовима. Наиме, алгинатне честице ће се добијати методом ултразвучног распршивања раствора алгината при чему ваздух који носи распршене честице полимера-аеросола у зависности од температуре и незасићености, у мањој или већој мери подстиче испаравање воде из њих и на тај начин им смањује величину, а тако добијене наночестице затим желирају у колони са оквашеним зидовима. Овако добијене наночестице испитаће се као носачи за имобилизацију алкалазе и пероксидазе из рена и њихова каталитичка својства ће се упоредити са имобилисаним системима са честицама добијеним електростатичком екструзијом.

Ензимска хидролиза протеина различитог порекла попут сојиних протеина, протеина беланцета, па до отпадних протеинских сировина је од изузетног значаја јер има неограничене могућности увећања вредности споредних и отпадних производа. Парцијалном и контролисаном ензимском хидролизом протеина могу се ослободити биоактивни ди-, три- и олигопептиди који поседују антиоксидативну, антимикробну и антитуморску активност због чега се добијени хидролизати могу користити као нови биоактивни суплементи функционалној храни. Индустријска алкална протеаза се највише користи као катализатор у овим процесима јер има веома широку специфичност према супстратима, односно, катализује раскидање великог броја пептидних веза унутар молекула протеина и стабилнија је у поређењу са другим протеазама. Активна је при рН 6.5-8.5, на температури између 45 °C и 60 °C, максимална активност постиже се на температури од око 60 °C, после које активност нагло опада. Алкалаза је ендо-протеаза серинског типа добијена субмерзном ферментацијом одређеног соја бактерије *Bacillus licheniformis*. Главна ензимска компонента је серинска протеаза *subtilisin Carlsberg* (алкална протеаза А), која је једна од најтемељније окарактерисаних бактеријских протеаза. Међутим, постоје бројни изазови код развоја индустријског ензимског процеса за хидролизу отпадних протеинских сировина, а они су углавном последица мале стабилности ензима у присуству великог броја инхибитора и немогућности изолације и поновне употребе ензима. Ензими су изузетно осетљиви на екстремне услове рН, температуре, присуство хемикалија због чега се користе само једном у шаржном процесу и не могу се рециклирати, што значајно ограничава њихову употребу. Ова ограничења и проблеми могу се превазићи њиховом имобилизацијом на различите носаче чиме се добијају стабилнији ензими, спречава њихова инактивација и смањује осетљивост на дејство хемикалија, посебно инхибитора.

Међутим, развој ефикасног, стабилног, довољно економичног имобилисаног система са алкалазом који има велики капацитет оптерећења и задржану активност, и који је погодан за употребу у дугорочном континуалном процесу, још увек има много нерешених питања. У оквиру дисертације планирано је превазилажење ових проблема развојем нових магнетит/алгинатних субмикронских честица као новог носача алкалазе, као и одговарајуће технике имобилизације и процеса за хидролизу индустријских протеинских супстрата. Посебни напори ће се уложити у развој нетоксичних, механички и термички стабилних носача који имају довољну површину и концентрацију функционалних група да би се избегли додатни кораци активације при ковалентној имобилизацији, и који дозвољавају употребу нетоксичних једињења за умрежавање ензима, а такође су отпорни на микробну контаминацију. Облагање магнетних честица алгинатом повећава њихову стабилност и спречава агрегацију, али и омогућава хемијско везивање ензима за функционалне (карбоксилне) групе на површини честица. Поред тога, предност ових система су олакшане манипулације биокатализатором применом спољашњег магнетног поља, мешањем и лакшим издвајањем из реакционог медијума без механичког стреса коме се излажу имобилисани ензими током центрифугирања и филтрирања.

Други ензимски систем који ће бити испитан у оквиру докторске дисертације је пероксидаза из рена имобилисана на магнетит/алгинат честицама и њена примена у уклањању синтетских боја из отпадних вода различитих грана индустрије. Пероксидазе (ЕС 1.11.1.X) су велика група ензима који користе различите пероксиде као електронске акцепторе у катализи бројних реакција оксидације. До сада је утврђено преко 30 различитих ензима који припадају овој групи. Као модел ензим изабрана је пероксидаза из корена рена (ЕС 1.11.1.7) захваљујући својој специфичности, лакој доступности и развијеним поступцима изоловања, пречишћавања и производње. Корен рена садржи велики број изоензима, али најзаступљенији и највећи значај има изоензим Ц. Пероксидаза из рена је мономерни гликопротеин, садржи хем кофактор који представља њен активни центар и два атома калцијума који су јој потребни за активност. Оксидује велики спектар једињења (феноли, индол, амини, сулфонат и др.) у присуству водоник-пероксида или неког другог пероксида. Овај ензим садржи остатке аминокиселина у дисталном и проксималном региону који су од есенцијалног значаја за каталитичку функцију. Пероксидаза из рена показала се као изванредан и применљив биокатализатор за уклањање синтетских боја и, што је најважније, различитих класа синтетских боја, захваљујући својој доступности, ниској цени и способности да катализује разградњу загађивача на селективан начин, са формирањем минималних количина споредних производа и без употребе токсичних материјала. Повећањем садржаја угљенохидратних компонената у молекулу, пероксидаза постаје термостабилнија, али још увек недовољно да би остала стабилна у условима високе концентрације токсичних материја и водоник-пероксида, што је потребно за њену примену у индустријским условима.

Циљ ове дисертације је да се добије активан биокатализаторски систем са повећаном термичком и оперативном стабилношћу, што је веома битно за практичну примену, нарочито при узастопном извођењу разградње синтетских боја у шаржном реактору, или при континуалном извођењу реакције у проточним реакторима. Да би се обезбедило лако заустављање реакције и издвајање имобилисаног ензима из реакционог медијума, од нарочитог значаја су честице магнетних својстава које омогућавају олакшану манипулацију биокатализатором и издвајање из реакционог система дејством спољашњег магнетног поља. Међутим, у току примене биокатализатора може доћи до нежељених губитака активности ензима услед спирања ензима са носача или денатурације ензима топлотом или под утицајем микрооколине носача. У том смислу потребно је испитати утицај величине честица, морфологије, зета потенцијала,

магнетних својстава, дебљине алгинатне превлаке, што се може мењати у широком распону променом параметара и начина синтезе, на активност и стабилност имобилисане пероксидазе. У оквиру рада планирано је да се упореде каталитичка својства имобилисане пероксидазе на магнетит/алгинатним честицама добијеним под различитим условима и применом различитих техника имобилизације и то: адсорпције, хемијског везивања и уметања ензима у хидрогел честице са аспекта примене у уклањању синтетских боја. Исто тако, оптимизоваће се процес обезбојавања антрахинонских боја имобилисаном пероксидазом на магнетит/алгинат честицама добијеним електростатичком екструзијом и ултразвучним распршивањем (испитаће се утицаји времена имобилизације, масеног односа ензима и носача, концентрације активирајућег агенса на масу везаног ензима и специфичну активност добијеног биокатализатора).

2.2. Научни циљеви докторске дисертације

Циљ овог истраживања је да се добију ефикасни биокатализатори за хидролизу сојиних протеина и протеина из беланцета, као и за пречишћавање отпадних вода из текстилне индустрије, а њихова ефикасност ће се испитати испитивањем активности биокатализатора, термичке и оперативне стабилности. У складу са предметом дисертације научни циљеви су следећи:

- 1) утврђивање структурних, морфолошких и магнетних својстава алгинатних магнетит/алгинат честица добијених применом различитих техника и различитих услова;
- 2) оптимизација улова ковалентне имобилизације алкалазе и пероксидазе на алгинатне честицама добијене електростатичком екструзијом, ултразвучним распршивање и на алгинатне честице са инкапсулираним магнетним честицама;
- 3) утврђивање утицаја величине, морфологије, хемијског састава носача као и ефекте полимерне превлаке на каталитичке карактеристике и стабилност имобилисане алкалазе и пероксидазе;
- 4) испитивање кинетике хидролизе сојиних протеина и поређење ефикасности имобилисаних система са алкалазом на основу добијених вредности кинетичких константи;
- 5) оптимизација процесних параметара у току хидролизе протеина применом алкалазе имобилисане под оптималним условима;
- 6) утврђивање механизма одвијања реакције хидролизе сојиних протеина на основу добијених кинетичких резултата и хемијске структуре насталих производа као и проучавање антиоксидативног потенцијала хидролизата протеина добијених са најефикаснијом имобилисаном алкалазом;
- 7) оптимизација процесних параметара у реакцији уклањања антрахинонских боја применом имобилисане пероксидазе из рена;
- 8) испитивање кинетике деградације две антрахинонске боје и поређење ефикасности имобилисаних система са пероксидазом на основу добијених вредности кинетичких константи;
- 9) утврђивање механизма одвијања реакције на основу добијених кинетичких резултата и хемијске структуре насталих производа као и проучавање токсичности отпадних вода пре и након ензимског третмана са најефикаснијим имобилисаним системом са пероксидазом.

Списак литературе

- (1) Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, L. S. Biochemistry, Sixth Edition; 2012; Vol. 53. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (2) Hou, R.-Z.; Yang, Y.; Li, G.; Huang, Y.-B.; Wang, H.; Liu, Y.-J.; Xu, L.; Zhang, X.-Z. Synthesis of a Precursor Dipeptide of RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) Catalyzed by the Industrial Protease Alcalase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2006, 44 (2), 73. <https://doi.org/10.1042/ba20050225>.
- (3) Bickerstaff, G. Immobilization of Enzymes and Cells. *Immobil. Enzym. Cells* 2003, 1051. <https://doi.org/10.1385/0896033864>.
- (4) Ilić, S., Optimizacija procesa imobilizacije alkalaze na česticama biopolimera za hidrolizu proteina, master završni rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2017.
- (5) Mogharrab, N.; Ghourchian, H.; Amininasab, M. Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon Modification of Accessible Lysines: Experiments and Simulation. *Biophys. J.* 2007, 92 (4), 1192–1203. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.092858>.
- (6) Hiner, A. N. P.; Hernández-Ruiz, J.; Rodríguez-López, J. N.; Arnao, M. B.; Varón, R.; García-Cánovas, F.; Acosta, M. The Inactivation of Horseradish Peroxidase Isoenzyme A2 by Hydrogen Peroxide: An Example of Partial Resistance Due to the Formation of a Stable Enzyme Intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2001, 6 (5–6), 504–516. <https://doi.org/10.1007/s007750100219>.
- (7) Husain, Q. Peroxidase Mediated Decolorization and Remediation of Wastewater Containing Industrial Dyes: A Review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2010, 9 (2), 117–140. <https://doi.org/10.1007/s11157-009-9184-9>.
- (8) Ryan, B. J.; Carolan, N.; Ó'Fágáin, C. Horseradish and Soybean Peroxidases: Comparable Tools for Alternative Niches? *Trends Biotechnol.* 2006, 24 (8), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.007>.
- (9) Silva, E.; Edwards, A. M.; Faljoni-Alario, A. Enzymatic Generation of Triplet Acetone by Deglycosylated Horseradish Peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990, 276 (2), 527–530. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90754-M](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90754-M).
- (10) Bansal, N.; Kanwar, S. S. Peroxidase(s) in Environment Protection. *Sci. World J.* 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/714639>.
- (11) Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349 (8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>.
- (12) Tran, D. N.; Balkus, K. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *ACS Catal.* 2011, 1 (8), 956–968. <https://doi.org/10.1021/cs200124a>.
- (13) Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.* 2011, 353 (16), 2885–2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>.
- (14) Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding Enzyme Immobilization. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38 (2), 453–468. <https://doi.org/10.1039/b711564b>.
- (15) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. Enzyme Immobilization in Biocatalysis: Why, What and How. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42 (15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
- (16) Ferreira-Dias, S.; Correia, A. C.; Baptista, F. O. Activity and Batch Operational Stability of *Candida Rugosa* Lipase Immobilized in Different Hydrophilic Polyurethane Foams during Hydrolysis in a Biphasic Medium. *Bioprocess Eng.* 1999, 21 (6), 517–524. <https://doi.org/10.1007/PL00009090>.
- (17) Bajpai, A. K.; Bhanu, S. Immobilization of α -Amylase in Vinyl-Polymer-Based Interpenetrating Polymer Networks. *Colloid Polym. Sci.* 2003, 282 (1), 76–83. <https://doi.org/10.1007/s00396-003-0921-2>.

- (18) Petri, A.; Gambicorti, T.; Salvadori, P. Covalent Immobilization of Chloroperoxidase on Silica Gel and Properties of the Immobilized Biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2004, 27 (2–3), 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.10.001>.
- (19) Knežević-Jugović, Z., *Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd*, 2008.
- (20) Šekuljica, N., *Enzimsko obezbojavanje antrahinonskih boja iz otpadnih voda, doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd*, 2016.
- (21) Georgiou, D.; Aivasidis, A. Cotton-Textile Wastewater Management: Investigating Different Treatment Methods. *Water Environ. Res.* 2012, 84 (1), 54–64. <https://doi.org/10.2175/106143011x13203357278381>.
- (22) Linton, J.; Walsh, S. The Effect of Technology on Learning during the Acquisition and Development of Competencies in Technology-Intensive Small Firms. *Int. J. Entrep. Behav. Res.* 2013, 19 (2), 165–186. <https://doi.org/10.1108/13552551311310365>.
- (23) Mester, T.; Tien, M. Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2000, 46 (1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00071-8).
- (24) Rauf, M. A.; Salman Ashraf, S. Survey of Recent Trends in Biochemically Assisted Degradation of Dyes. *Chem. Eng. J.* 2012, 209, 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.015>.
- (25) Chen, C.; Chi, Y. J.; Xu, W. Comparisons on the Functional Properties and Antioxidant Activity of Spray-Dried and Freeze-Dried Egg White Protein Hydrolysate. *Food Bioprocess Technol.* 2012, 5 (6), 2342–2352. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0606-7>.
- (26) Mahmud, M. I.; Malone, W. T.; Cordle, C. T. Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties. *J. Food Sci.* 1992, 57 (5), 1223–1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb11304.x>.
- (27) Adler-Nissen, J. Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility. *J. Agric. Food Chem.* 1976, 24 (6), 1090–1093. <https://doi.org/10.1021/jf60208a021>.
- (28) Donohue, T. M.; Osna, N. A. Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol-Induced Tissue Injury. *Alcohol Res. Heal.* 2003, 27 (4), 317–324.
- (29) Kovacs-Nolan, J.; Phillips, M.; Mine, Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 (22), 8421–8431. <https://doi.org/10.1021/jf050964f>.
- (30) Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M. J.; Rodríguez-Sevilla, M. D.; Mateos-Aparicio, I. Chemical Composition and Dietary Fibre of Yellow and Green Commercial Soybeans (Glycine Max). *Food Chem.* 2007, 101 (3), 1216–1222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.025>.

3. Полазне хипотезе

Полазне хипотезе које се могу издвојити као основа за започињање научно-истраживачког рада у оквиру ове докторске дисертације су следеће:

- ултразвучно распршивање омогућиће добијање субмикронских алгинатних честица униформних величина;
- својства алгинатних честица са магнетитом као што су механичка чврстоћа, дифузионе карактеристике и порозност, стабилност у различитим пуферима и растворима киселина ће бити знатно боље од алгинатних честица без магнетита;
- ензимском хидролизом се постиже контрола над функционалношћу производа, тако да се бирају специфични ензими и дефинишу реакциони фактори. Ензимски хидролизати биолошки неактивних протеина добијају све више пажње јер се ослобађају биоактивни пептиди који се могу користити у функционалној храни и

додацима исхрани. Применом алкалазе у хидролизи протеина соје могу се ослободити биоактивни пептиди и повећати нутритивна вредност протеина;

- биокаталитичка својства алкалазе као што су отпорност на аутокатализу, стабилност у присуству контаминаната и оперативна стабилност, могу се вишеструко побољшати имобилизацијом ензима на магнетит/алгинат честице применом различитих метода;
- ензими као катализатори уклањања синтетских боја се понашају као редокс-активни молекули који стварају реактивне слободне радикале одговорне за низ комплексних реакција раскидања везе у молекулу боје. Применом пероксидазе из рена у уклањању боје из отпадних вода може се значајно смањити њихова токсичност;
- биокаталитичка својства пероксидазе имобилисане на магнетним честицама модификованим алгинатом попут активности, кинетичких својстава и стабилности могу се мењати у широком опсегу вредности контролисањем параметара у току добијања честица и у поступку имобилизације ензима;
- избором методе синтезе као и подешавањем величине, морфологије, дебљине превлаке алгината и контролом параметара синтезе могуће је добити честице одговарајућих магнетних својства што би омогућило олакшану сепарацију биокатализатора из реакционе смеше и тиме вишеструку примену у узастопним шаржним процесима.

Детаљан преглед литературе потврђује да су приказане полазне хипотезе и планирано истраживање у складу са правцима истраживања у савременој научној литератури.

4. Научне методе истраживања

Добијање магнетних честица, алгинатних честица и магнетит/алгинат честица представља прву фазу експеримента. Магнетне микрочестице (дијаметар $<100\ \mu\text{m}$) ће се хемијски синтетисати, док ће се магнетит/алгинатне честице добијати помоћу електростатичке екструзије под различитим условима (магнетит/алгинат однос, примењени напон, пречник игле, растојање између електрода). За добијање алгинатних субмикронских честица, поред електростатичке екструзије, користиће се метода ултразвучног распршивања. За ту намену користиће се ултразвучни генератор (KCW-6TD, 220V/50Hz, Omron Profi Sonic) са грејачем ради регулисања температуре ваздуха (за добијање сушених честица) и без грејача (за добијање влажних честица). Стаклена цев у којој је смештен грејач, једним крајем је повезана са компресором који омогућава струјање топлог ваздуха, а други крај се рачва на два дела. Један део тог краја повезан је директно са уређајем у чијем се резервоару налази раствор натријум-алгината преко пластичног црева, а други део такође преко пластичног црева омогућава транспорт сушених честица које су ношене струјом ваздуха до колоне са оквашеним зидовима са одговарајућим раствором калцијум-хлорида. Процесни услови за добијање наночестица калцијум-алгината су следећи: улазна температура ваздуха од $20\ ^\circ\text{C}$ до $150\ ^\circ\text{C}$, проток ваздуха из компресора од $0.1\ \text{dm}^3/\text{min}$ до $10\ \text{dm}^3/\text{min}$ и проток кроз перисталтичку пумпу од $0.5\ \text{dm}^3/\text{min}$ до $5\ \text{dm}^3/\text{min}$. Честице најбољих карактеристика (димензије, сферичност, расподела величина, магнетна својства) користиће се за имобилизацију ензима.

Оптимизација ковалентне имобилизације ензима алкалазе на алгинатне честице и магнетит/алгинатне честице добијене електростатичком екструзијом и ултразвучним распршивањем представља другу фазу експеримента. Испитиваће се утицај услова имобилизације попут вредности рН, моларитета ТРИС пуфера, количине додате алкалазе, начина хемијске активације функционалних група честица и количине

хемијског агенса за активацију, као и самог времена контакта ензима са активираним честицама на активност, масу везаног ензима и принос активности. Количина везане алкалазе биће одређивана стандардним методама за одређивање протеина и то углавном Бредфордовом методом (*Bradford*), док ће се протеолитичка активност одређивати спектрофотометријски праћењем хидролизе хромогеног деривата казеина, азоказеина.

Морфолошке карактеристике добијених честица са и без имобилисаног ензима анализираће се применом скенирајуће електронске микроскопије (СЕМ), микроскопијом атомских сила и трансмисионом електронском микроскопијом. Утврдиће се величина честица као и морфологија површине магнетних честица са и без алгинатне превлаке. Како би се боље разумела природа потенцијално успостављених веза између ензима и носача, честице носача и имобилизата биће карактерисане инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовим трансформацијама. Методом динамичког расипања светлости испитаће се расподела величине честица и зета потенцијал. Мерење зета потенцијала магнетних честица са и без алгинатне превлаке може указати на потенцијално својство да полимерна превлака стабилизује магнетне честице. Магнетна својства честица и јачина коерцитивног поља испитаће се применом SQUID магнетометрије (суперпроводни квантни интерферометар). Магнетна својства честица ће се упоредити на основу хистерезисних кривих за магнетне и магнетит/алгинат честице на температурама од 5 К и 300 К.

Активност слободне и имобилисане алкалазе пратиће се и у реакцији хидролизе сојиних протеина у индустријски релевантним условима, односно у реактору са интензивним мешањем и у присуству нечистоћа на основу мерења утрешка калцијум-хидроксида за одржавање константне рН вредности током хидролизе, *тзв.* рН стат метода, користиће се и тринитробензенсулфонска киселина при хидролизи, *тзв.* ТНБС метода. Кинетика реакције са нативним и имобилисаним ензимом ће бити испитана праћењем брзине реакције хидролизе сојиних протеина при различитим почетним концентрацијама супстрата у почетним условима, док ће кинетички параметри бити одређени на уобичајен начин применом Лајнвивер-Буркове (*Lineweaver-Burk*) методе, Ханес-Вулфове (*Hanes-Woolf*) методе и других метода линеаризације (*Michaelis-Menten*) једначине. Исто тако, испитаће се стабилност имобилисане алкалазе, могућност употребе кроз више циклуса извођења реакције хидролизе сојиних протеина у шаржном реактору са механичким мешањем и потенцијално задржавање активности након одређеног времена складиштења.

Добијени резултати треба да помогну даљем развоју имобилисаног система са пероксидазом из рена. Честице најбољих карактеристика (димензије, сферичности, расподела величине, магнетна својства) биће коришћене за имобилизацију пероксидазе из рена. Количина везане пероксидазе и њена активност биће одређиване спектрофотометријском методом са пирогалолом као супстратом. Испитаће се утицаји времена имобилизације, масеног односа ензима и носача, концентрације активирајућег агенса на масу везаног ензима и специфичну активност добијеног биокатализатора. Ефикасност имобилисаних пероксидаза биће упоређене и на основу добијених кинетичких параметара у реакцији оксидације две антрахинонске боје *Acid Violet 109* и *Acid Blue 225*.

5. Очекивани научни допринос

Иако су имобилизација ензима на нано/микро магнетним честицама обложеним различитим полимерним материјалима, као и природа интеракција између ензима и носача предмет актуелних савремених истраживања, веома мало се зна о имобилизацији протеолитичких ензима и пероксидаза на ове носаче. Уопштено, литературни подаци указују да је веома мала пажња научне јавности усмерена на испитивање имобилизације

протеаза на чврсте носаче, и поред великог индустријског значаја протеолитичких ензима. Поред тога, ензимски третмани обојених отпадних вода применом имобилисаних пероксидаза привлаче све више пажње из разлога што су јефтинији, еколошки прихватљиви и ефикаснији у поређењу са традиционалним физичко-хемијским методама пречишћавања. На основу нашег увида, нема података о имобилизацији алкалазе и пероксидазе на магнетним честицама обложеним алгинатом као ни о њиховој примени у реакцији хидролизе протеинских супстрата и обезбојавању отпадних вода. Очекивани научни доприноси предложене докторске дисертације су:

- развој методе за добијање алгинатних честица ултразвучним распршивањем које могу да се користе као носачи за имобилизацију ензима;
- одређивање оптималних услова хемијске имобилизације алкалазе на различитим хидрогел честицама добијеним електростатичком екструзијом и ултразвучним распршивањем са становишта масе везаног ензима, активности и стабилности биокатализатора;
- утврђивање утицаја величине, хемијског састава и морфолошких својстава честица на активност и стабилност имобилисане алкалазе и успостављање корелације између величине честица, наелектрисања и магнетних својстава и стабилности биокатализатора;
- оптимизација процесних параметара у реакцији хидролизе сојиних протеина катализованом слободном алкалазом и алкалазом имобилисаном на одабране алгинатне честице;
- развој метода за добијање магнетит/алгинат честица са имобилисаном пероксидазом које се могу користити за обезбојавање антрахинонских боја;
- научни допринос разумевању механизма и кинетике ензимске хидролизе индустријских протеина у различитим системима са имобилисаном алкалазом на алгинатним и магнетит/алгинат честицама;
- научни допринос разумевању механизма и кинетике ензимске разградње антрахинонских боја у различитим системима са имобилисаном пероксидазом, нарочито врстама и ефектима инхибиције.

6. План истраживања и структура рада

6.1. План истраживања

План истраживања у оквиру докторске дисертације одвијаће се кроз следеће фазе:

- преглед научне литературе и сакупљање релевантних података;
- дефинисање предмета и циља истраживања;
- припрема алгинатних честица електростатичком екструзијом и ултразвучним распршивањем;
- припрема магнетит/алгинат честица и испитивање њихових морфолошких и магнетних својстава;
- испитивање утицаја величине и хемијског састава честица (односно магнетит/алгинат), на масу и каталитичка својства имобилисане алкалазе;
- оптимизација процеса имобилизације алкалазе на одабраним хидрогел честицама;
- хидролиза сојиних протеина имобилисаним алгинатним честицама и слободном алкалазом;
- оптимизација имобилизације пероксидазе на магнетит/алгинатним честице;

- испитивање кинетике реакције са слободним и имобилисаним ензимима у реалним системима са реалним супстратима;
- примена имобилисане пероксидазе за обезбојавање антрахинонских боја.

6.2. Структура рада

Докторска дисертација треба да садржи следеће елементе:

- Насловну страницу на српском језику
- Насловну страницу на енглеском језику
- Страницу са информацијама о менторима, члановима комисије за одбрану докторске дисертације и о датуму одбране
- Изјаве захвалности
- Странице са подацима о докторској дисертацији на српском језику
- Странице са подацима о докторској дисертацији на енглеском језику
- Садржај
- Текст рада по поглављима
 - Увод
 - Теоријски део
 - Експериментални поступак Материјале
 - Методе
- Резултате истраживања и дискусију
- Закључак
- Литературу
- Прилоге
- Биографију аутора
- Изјаву о ауторству,
- Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада,
- Изјаву о коришћењу

7. Закључак и предлог

На основу изнетих података Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације кандидата Марка (Милорад) Јоновића, дипл. инж. технол., „**Имобилисане протеазе и пероксидазе на магнетним микронским и субмикронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода**“, научно заснована и предлаже Наставно-научном већу да је прихвати. За менторе се предлажу проф. др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду и др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду. Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области *Технолошко инжењерство*, ужој научној области *Хемијско инжењерство*, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду.

У Београду, 16.12.2022.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

др Бранимир Југовић, научни саветник,
Институт техничких наука САНУ у Београду

др Верица Ђорђевић, научни саветник
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

др Никола Милашиновић, редовни професор,
Криминалистичко-полицијски универзитет у Београду