

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/156

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

04.07.2023.

(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:

Добијање и карактеризација имобилизата индустријски значајних гликозидних
хидролаза на модификованим смектитима

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Вишња (Драган) Косић

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: 2019.

4. Година уписа на докторске студије: 2020.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ :

Име и презиме ментора: др Зорица Кнежевић-Југовић

Звање: Редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Knežević-Jugović, Z.**, Culetu, A., Mijalković, J., Duta, D., Stefanović, A., Šekuljica, N., Đorđević, V., Antov, M., Impact of Different Enzymatic Processes on Antioxidant, Nutritional and Functional Properties of Soy Protein Hydrolysates Incorporated into Novel Cookies (2023) **Foods**, 12 (1), art. no. 24, ISSN: 2304-8158; IF(2021) 5,561. Food Science & Technology 35/144; DOI: 10.3390/foods12010024.
2. Perović, M.N., **Knežević Jugović, Z.D.**, Antov, M.G. Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction (2020) **Journal of Food Engineering**, 276, art. no. 109894. ISSN: 0260-8774; IF(2020) 5,354. Engineering, Chemical 28/143; Food Science & Technology 23/144; DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109894.
3. 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 (2017) **Applied Clay Science**, 135, pp. 103-111. ISSN: 0169-1317; IF(2017) 3,641; Materials Science, Multidisciplinary 68/285; DOI: 10.1016/j.clay.2016.09.011.
4. Radovanovic, M., Jugovic, B., Gvozdenovic, M., Jokic, B., Grgur, B., Bugarski, B., **Knežević-Jugovic, Z.**, Immobilization of α -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline (2016) **Starch/Staerke**, 68 (5-6), pp. 427-435. ISSN 0038-9056; IF(2016) 1,837; Food Science & Technology 51/130; DOI: 10.1002/star.201500161.
5. Salim, A.A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., **Knežević-Jugović, Z.** Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods (2017) **Bioresource Technology**, 228, pp. 193-200. ISSN: 0960-8524; IF(2017) 5,807. Biotechnology & Applied Microbiology 13/161; Energy & Fuels 13/97; DOI: 10.1016/j.biortech.2016.12.081.

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

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ 2 :

Име и презиме ментора: Александра Милутиновић-Николић

Звање: Научни саветник

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. U. Andjelković, A. Milutinović-Nikolić, N. Jović-Jovičić, P. Banković, T. Bajt, Z. Mojović, Z. Vujčić, D. Jovanović, “Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilization on modified beidellite nanoclays”, *Food Chemistry*, **168** (2015), 262-269. ISSN: 0308-8146; IF(2015) 4,052; Chemistry, Applied 7/72; Food Science & Technology 7/125; DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.055
2. M. Marković, S. Marinović, T. Mudrinić, M. Ajduković, N. Jović-Jovičić, Z. Mojović, J. Orlić, A. Milutinović-Nikolić, P. Banković, “Co(II) impregnated Al(III)-pillared montmorillonite-synthesis, characterization and catalytic properties in Oxone activation for dye degradation”, *Applied Clay Science*, **182** (2019) 105276 (9 pages). ISSN: 0169-1317; IF(2019) 4,605; Materials Science, Multidisciplinary 82/314; DOI: 10.1016/j.clay.2019.105276
3. I. Ilić, A. Milutinović-Nikolić, Z. Mojović, Z. Vuković, P. Vulić, I. Gržetić, P. Banković, N. Jović-Jovičić, “Oxidative degradation of aromatic N-compounds using cobalt containing montmorillonite-based catalysts”, *Applied Clay Science*, **193** (2020) 105668 (11 pages). ISSN: 0169-1317; IF(2020) 5,467; Materials Science, Multidisciplinary 94/334; DOI: 10.1016/j.clay.2020.105668
4. G. Stevanović, N. Jović-Jovičić, J. Krstić, A. Milutinović-Nikolić, P. Banković, A. Popović, M. Ajduković, “Nanocomposite Co-catalysts, based on smectite and biowaste-derived carbon, as peroxymonosulfate activators in degradation of tartrazine“, *Applied Clay Science*, **230** (2022) 106718 (8 pages). ISSN: 0169-1317; IF(2021) 5,907; Materials Science, Multidisciplinary 105/345; DOI: 10.1016/j.clay.2022.106718
5. N. Jović-Jovičić, Z. Mojović, M. Darder, P. Aranda, E. Ruiz-Hitzky, P. Banković, D. Jovanović, A. Milutinović-Nikolić, “Smectite-chitosan-based electrodes in electrochemical detection of phenol and its derivatives”, *Applied Clay Science*, **124-125** (2016), 62-68. ISSN: 0169-1317; IF(2016) 3,101; Materials Science, Multidisciplinary 68/275; DOI:10.1016/j.clay.2016.01.052

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

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 29.06.2023. 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 **Вишње Косић**, број индекса 4003/20, под називом: „**Добијање и карактеризација имобилизата индустријски значајних гликозидних хидролаза на модификованим смектитима**“.

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

За менторе се одређују др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Александра Милутиновић-Николић, научни саветник Универзитета у Београду, Институт за хемију, технологију и металургију-Институт од националног значаја за Републику Србију.

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 **Вишње Д. Косић, мастер инжењера биотехнологије**, за израду докторске дисертације

На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета одржаној 11.05.2023. одлуком број 35/100 од 11.05.2023., именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидаткиње **Вишње Д. Косић, мастер инжењера биотехнологије**, за израду докторске дисертације и научне заснованости теме „Добијање и карактеризација имобилизата индустријски значајних гликозидних хидролаза на модификованим смектитима“.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидаткиње, Комисија подноси следећи:

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидаткињи

1.1. Биографски подаци

Вишња (Драган) Косић је рођена 23.03.1995. године у Краљеву (Србија). Основну и средњу школу (гимназија – општи смер) завршила је у Краљеву. Основне академске студије Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду уписала је школске 2014/2015 и дипломирала 2018. године са средњом оценом 9,79. Завршни рад под називом *Производња целулаза и пектиназа помоћу Bacillus sp. ферментацијом на сојиној сачми* одбранила је 25.09.2018. године са просечном оценом 10,00 под менторством проф. др Зорице Кнежевић-Југовић.

Мастер академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2018/2019. године и завршила са средњом оценом 9,44. Одбраном Мастер рада 26.09.2019. године под називом *Производња протеаза и мананаза ферментацијом сојине сачме помоћу пробиотског соја Bacillus subtilis* са просечном оценом 10,00 стекла је звање Мастер инжењер технологије – мастер инжењер биотехнологије.

Школске 2020/2021. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је прву годину докторских академских студија – студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све испите предвиђене планом и програмом, укључујући и Завршни испит, са средњом оценом 9,73.

Од априла до децембра 2020. била је запослена у компанији West Pharmaceutical на позицији трансфер инжењера. Од марта 2021. запослена је на Институту за хемију, технологију и металургију у Центру за катализу и хемијско инжењерство у истраживачком звању истраживач-приправник.

Током основних академских студија проводи јун 2018. године на стручној пракси у Институту за заштиту биља и животну средину, на одсеку за фитофармацију и животну средину. Ту се упознаје са применом гасне и течне хроматографије приликом одређивања садржаја активних супстанци у различитим пестицидима, као и спектрофотометријским одређивањем фотосинтетских пигмената у биљним ткивима.

У оквиру свог научно-истраживачког рада у области биотехнологије, бави се синтезом и карактеризацијом неорганских материјала на бази бентонитних глина, испитивањем услова имобилизације хидролитичких ензима са потенцијалном применом у прехранбеној индустрији на овако добијеним материјалима, проценом приноса и ефикасности имобилизације, проучавањем ензимске стабилности и каталитичке ефикасности.

Кандидаткиња говори енглески (напредни ниво), шведски (средњи ниво) и француски (почетни ниво) језик.

Члан је Биохемијског друштва Србије и Српског хемијског друштва.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Вишња Д. Косић, мастер инжењер биотехнологије, научно-истраживачки рад у оквиру докторских академских студија започела је 2021. године на Универзитету у Београду, Институт за хемију, технологију и металургију – Институт од националног значаја за Републику Србију, у центру за катализу и хемијско инжењерство, где је од 1.3.2021. запослена као истраживач-приправник. Научна активност кандидаткиње је усмерена на синтезу модификованих смектитних носача и њихову комплетну карактеризацију, као и разматрање могућности њихове примене за имобилизацију одабраних хидролитичких ензима. У оквиру свог научно-истраживачког рада, кандидаткиња је остварила допринос у реализацији задатака предвиђених планом и програмом, показала иновативност, самосталност и креативност као и висок ниво колегијалности и склоност ка тимском раду. Кандидаткиња је показала смисао за добру организацију експерименталног рада и извођење експеримената који се односе на предмет докторске дисертације. На основу приказаних референци у библиографској листи може се уочити стечено знање о основним принципима и методологији научно-истраживачког рада.

Током докторских академских студија, кандидаткиња је положила све предмете (укупно 12) предвиђене планом и програмом докторских академских студија са просечном оценом 9,73 и освојених 80 ЕСПБ. 30.09.2022. године кандидаткиња је одбранила Завршни испит под називом *Имобилизација хидролитичких ензима на смектитима* пред комисијом у саставу: проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а, проф. др Бранко Бугарски, редовни професор ТМФ-а и проф. др Душан Мијин, редовни професор ТМФ-а.

Положени испити на докторским академским студијама су:

Редни број	Шифра предмета	Назив предмета	ЕСПБ	Оцена
1.	Д104ББ	Индустријска микробиологија	5	десет (10)
2.	Д126	Имобилисани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	6	десет (10)
3.	Д196	Специјална поглавља преноса масе	4	десет (10)
4.	Д103	Биохемијска кинетика	5	десет (10)
5.	Д124	Биомаса као извор енергије	4	десет (10)
6.	Д150	Одабрана поглавља инструменталне анализе	7	десет (10)
7.	Д166	Санитарна микробиологија	4	десет (10)
8.	Д101	Хемијска кинетика	5	седам (7)
9.	Д102	Одабрана поглавља биохемије - витамини	5	десет (10)
10.	Д102	Одабрана поглавља нумеричке анализе	5	десет (10)
11.	ДСЕНГ	Енглески језик	допунски испит	десет (10)
12.	ДЗИ	Завршни испит	30	десет (10)
			Укупно ЕСПБ	Просечна оцена
			80	9,73

Списак објављених научних радова и саопштења:

Предавања по позиву са међународног скупа штампана у целини (М31)

1. S. Pavlović, **V. Kosić**, D. Lončarević, M. Kostić, D. Marinković, „Acceleration of biodiesel production from off-grade oil over waste-based CaO catalyst“ *Proceedings of 10th International Conference "Fuel Science - From Production to Propulsion"*, Fuel Science Center, RWTH Aachen University, Aachen, Germany (2022), May 10-12, pp. 83-84.

Саопштења са међународног скупа штампана у целини (М33)

1. S. Pavlović, **V. Kosić**, D. Marinković, M. Kostić, Biodiesel Production From Off Grade Oil By Transesterification Over Differently Granulated Waste-Based CaO Catalysts, *Proceedings of 2nd International Conference on Green Energy and Environmental Technology*, Rome, Italy (2022), July 27-29, pp. 17-21.
2. **V. Kosić**, S. Pavlović, N. Božić, B. Dojnov, G. Stevanović, Z. Knežević-Jugović, A. Milutinović-Nikolić, Immobilization of α -amylase from *Bacillus paralicheniformis* on bentonites, *Proceedings of 16th International Conference on fundamental and applied aspects of Physical chemistry, Society of Physical Chemists of Serbia*, Beograd, Serbia (2022), September 26-30, pp. 161-164.
ISBN 978-86-82475-42-2

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34)

1. **V. Kosić**, N. Božić, B. Dojnov, G. Stevanović, P. Banković, A. Milutinović-Nikolić, Z. Knežević-Jugović, The tailings from coal mine instead of waste became applicable as enzyme supports, Programme and abstract book of Biotechnology for a Circular Bioeconomy, AFOB-EFB Virtual Conference (2023), March 28-29, pp.65.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

Према резултатима оствареним на докторским академским студијама и наведеним саопштењима са међународних скупова, кандидаткиња је показала способност и интерес за бављење научно-истраживачким радом. Висок ниво самосталности кандидаткиње огледа се у повезивању досадашњих истраживања у изабраној области са експерименталним радом и креирању методологије рада. Поред тога, кандидаткиња са великом пажњом и високим нивоом одговорности обавља све постављене задатке у задатом року. На основу биографских података и способности кандидата, Комисија је мишљења да је Вишња Д. Косић, мастер инжењер биотехнологије, подобна за успешан и ефикасан теоријски и експериментални рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

За ефикасну разградњу и модификацију, односно биопроцесовање сложених, индустријски релевантних угљених хидрата, користе се углавном ензими из класе гликозидних хидролаза. Иако су гликозидне хидролазе услед свог значаја широко заступљене у свим организмима, из индустријске перспективе, микроорганизми су погодни произвођачи с обзиром на лакоћу узгоја и одговарајући принос циљних ензима, као и увећања размера процеса. Индустријска употреба ензима је често отежана чињеницом да су услови који су повезани са њиховом потенцијалном применом (нпр. екстремна вредност рН или температура) често неповољни за ензиме. Стога, да би се искористили у индустрији, ензими морају бити побољшани како би издржали процесне услове, што је често праћено додатном модулацијом њихових каталитичких својстава. Имобилизација је уобичајен начин за побољшање стабилности ензима.

Под имобилисаним ензимом се у ширем смислу сматра сваки молекул ензима коме је ограничена слобода кретања у простору и који задржава каталитичку активност. У већини случајева, овакав биокатализатор је стабилнији и не губи активност током дужег времена складиштења и употребе у односу на нативан ензим, а реакције катализоване имобилисаним ензимом се могу одвијати континуално. Због високе специфичности и селективности, велике ефикасности и приноса, благих реакционих услова, мањих енергетских трошкова ензимске катализе и олакшаног поступка издвајања и пречишћавања финалних производа, индустријска примена ових биокатализатора завређује све већу пажњу у односу на традиционалне хемијске поступке. За развој једног имобилисаног ензимског система неопходно је изабрати носач и методу имобилизације, оптимизовати услове имобилизације као и процесне параметре у току примене имобилисаног катализатора у конкретној реакцији.

Већина система ензим-носач је специфична за сваки појединачни случај, па се проблем ефикасности мора експериментално решавати.

Природни неоргански материјали попут бентонита, који су богати минералима глина, смектитима, већ су испитивани као носачи за имобилизацију ензима [1, 2]. Смектити су хемијски инертни, термостабилни и јефтини, имају веома добро дефинисану слојевиту структуру и могућност измене катјона, па се релативно лако могу модификовати до материјала жељених својстава. Еколошки су прихватљиви и широко распрострањени у природи. Уградња одабраних функционалних група, као и велика специфична површина омогућавају да модификовани смектити буду добри материјали за примену у широком спектру индустрије – за уклањање загађујућих супстанци, у третману отпадних вода, у медицини, као носачи пестицида, адсорбенти и др.

У литератури су испитани модификовани бентонити који су примењени за имобилисање хидролитичких ензима, међу којима су липазе [3, 4, 5], пектиназе [6, 7], амилазе [8, 9] и инвертазе [2]. Нековалентне методе везивања ензима на носач су најчешће коришћене због једноставности и економичности, а као њихов главни недостатак издваја се слаба повезаност биокатализатора са носачем. За модификовање бентонита приликом имобилизације липазе, коришћене су органске супстанце [4, 5] и у тим случајевима ензим се везивао хидрофобним, Ван дер Валсовим и електростатичким силама на носач. α -Амилаза имобилисана је адсорпцијом на спољашњој површини бентонита [9]. Ковалентно везивање α -амилазе је примењено у имобилизацији на хитозан-монтморионитни нанокомпозитни носач [8]. Хитозан је препознат као носач са великим предностима због своје нетоксичности, доступности и способности да остварује везе са ензимима преко својих амино и хидроксилних група. Пектиназе су имобилисане нековалентно на бентонитима [7] и ковалентно на алгинатно-монтморионитном носачу [10]. За имобилизацију ксиланаза, до сада су коришћени различити наноматеријали због предности попут велике додирне површине, биокompatibilности, великог капацитета везивања и добре хемијске и термичке стабилности. Бентонит кисело активиран различитим концентрацијама хлороводоничне киселине је употребљен као носач за имобилизацију ксиланазе из *Trichoderma reesei* [11]. У свим наведеним случајевима, карактеризација имобилисаних ензима се изводила проучавањем кинетике и одређивањем кинетичких константи, оптималног рН и температурног опсега, термичке стабилности и промене активности током складиштења, као и могућност поновне употребе ензима. Као једна од главних предности имобилисаних ензимских система за потенцијалну практичну примену издваја се задржавање активности на високим температурама. Већином је у литературним примерима показано да се имобилисани ензими боље прилагођавају променама рН и температурних услова средине. Такође, након дужег складиштења имобилизата, сачувана је почетна ензимска активност. Иако је примена модификованих бентонита економична и пружа одговарајуће услове за ензимску стабилност и каталитичку ефикасност, највећи проблеми се јављају приликом имобилизације ензима на носач и успостављање интеракција или веза ензима са носачем. Већина наведених случајева базирана је на имобилизацији ензима на носач адсорпцијом. У случају када долази до губитка каталитичке активности имобилизацијом претпоставља се да су узрок стерне сметње због чега ензимски молекули не могу заузети најповољнију конформацију за прилазак супстрата. У наведеним литературним примерима ковалентне имобилизације [6, 8, 10], коришћени су скуп и токсични агенси попут глутаралдехида. Било би интересно проучити другачије методе активације површине носача. Исти носач може бити погодан за један ензим, а код другог може довести до губитка активности [5, 9]. Сваки систем ензим-

носач потребно је појединачно испитати за утврђивање оптималних параметара којима ће се постићи максимална каталитичка активност уз повећану стабилност ензима. Приступ супстрата активном центру ензима је такође од великог значаја и може се дискутовати на тему порозне структуре смектита и доступности активног места везаног ензима према супстрату, који је у највећем броју случајева велики органски молекул.

Предмет ове докторске дисертације биће усмерен на проналажење оптималног носача за одабрану гликозидну хидролазу, комерцијалне као и продуковане у лабораторији и то претежно оне које модификују природне угљене хидрате скроб и/или ксилан, као и комплетну карактеризацију материјала, проучавање ензимске стабилности и каталитичке ефикасности. Први део научно-истраживачке активности кандидата биће усмерен на синтезу модификованих смектитних носача, разматрање могућности њихове примене за имобилизацију одабраних хидролитичких ензима, праћење ензимске активности имобилисаног ензима, процену приноса и ефикасности имобилизације. Полазни немодификовани и модификовани смектити који би се користили за имобилизацију хидролитичких ензима биће хемијски, структурно, текстуално и морфолошки окарактерисани. Поред почетне ензимске активности, испирања ензима са носача и ензимске активности имобилизата, приноса и ефикасности имобилизације, потребно је проучити и испитати температурну и рН стабилност, могућност складиштења и рециклације, као и одредити кинетичке константе.

Задаци постављени темом ове дисертације су:

- Модификације смектита различитим методама ради добијања оптималног носача за одабрани хидролитички ензим (α -амилазу, ксиланазу) који ће се на њега имобилисати;
- Карактеризација добијених материјала одговарајућим физичко-хемијским методама;
- Испитивање капацитета носача за везивање наведених ензима и ефикасности имобилизације;
- Испитивање термичке и оперативне стабилности, као и стабилности током складиштења овако добијених биокатализатора, праћење промена рН и температурног оптимума у односу на нативан ензим;
- Испитивање могућности увећања размера процеса (тзв. scale up) за потенцијалну примену у индустрији, пре свега у прехранбеној индустрији за добијање хидролизата скроба и функционалних ксилоолигосахарида као производа високе вредности.

Литература:

- [1] Pourkhanali, K., Khayati, G., Mizani, F., Raouf, F. (2022). Characterization of free and immobilized lipase from *Penicillium* sp. onto three modified bentonites: A comparative study, *Journal of Biotechnology*, 344, 57-69.
- [2] Andjelković, U., Milutinović-Nikolić, A., Jović-Jovičić, N., Banković, P., Bajt, T., Mojović, Z., Vujčić, Z., and Jovanović, D. (2015). Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilisation on modified beidellite nanoclays, *Food Chemistry*, 168, 262-269.

- [3] Díaz Ramos, M., Giraldo Gómez, G. I., & Sanabria González, N. (2014). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on bentonite modified with benzyltriethylammonium chloride. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 99, 79–84.
- [4] Dong, H., Li, J., Li, Y., Hu, L., & Luo, D. (2012). Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. *Chemical Engineering Journal*, 181-182, 590–596.
- [5] Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., & Sedaghat, M. E. (2009). Enzyme immobilization: Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Applied Clay Science*, 43(3), 289–295.
- [6] Karakuş, E., & Pekyardımcı, Ş. (2012). Comparison of Covalent and Noncovalent Immobilization of Malatya Apricot Pectinesterase (*Prunus armeniaca* L.). *Artificial Cells, Blood Substitutes & Biotechnology*, 40(1/2), 132–141.
- [7] Karakuş, E., Özler, A., & Pekyardımcı, Ş. (2008). Noncovalent Immobilization of Pectinesterase (*Prunus armeniaca* L.) onto Bentonite. *Artificial Cells, Blood Substitutes & Biotechnology*, 36(6), 535–550.
- [8] Mardani, T., Khiabani, M. S., Mokarram, R. R., & Hamishehkar, H. (2018). Immobilization of α -amylase on chitosan-montmorillonite nanocomposite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 354–360.
- [9] Sedaghat, M. E., Ghiaci, M., Aghaei, H., & Soleimanian-Zad, S. (2009). Enzyme immobilization. Part 3: Immobilization of α -amylase on Na-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science*, 46(2), 125–130.
- [10] Mohammadi, M., Khakbaz Heshmati, M., Sarabandi, K., Fathi, M., Lim, L.-T., & Hamishehkar, H. (2019). Activated alginate-montmorillonite beads as an efficient carrier for pectinase immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 253–260.
- [11] Riadi, L., Chrisnasari, R., Kristanto, J., Bigraveda, C. C., Sanoe, M. (2022). Immobilization of xylanase on acid pretreatment bentonite as green biocatalyst. *AIP Conference Proceedings* 2470, 040001.

3. Полазне хипотезе

Ова докторска дисертација је заснована на следећим хипотезама:

- У поређењу са традиционалним хемијским поступцима, примена α -амилаза и ксиланаза омогућава већу специфичност и селективност, блаже реакционе услове, мање енергетске трошкове и лакше издвајање и пречишћавање производа. Имобилизација је уобичајени начин за побољшање стабилности ензима.
- Природни неоргански материјали попут бентонита, богати смектитима, хемијски су инертни, јефтини и термостабилни. Различитим модификацијама добијају се материјали жељених својстава који би могли да се користе као носачи за имобилизацију конкретних хидролитичких ензима.

- Правилним одабиром одговарајућих комбинација носач-ензим добиће се биокатализатор побољшаних каталитичких својстава, поспешене термичке и оперативне стабилности са потенцијалном применом у прехранбеној индустрији за добијање производа високе вредности.

4. Научне методе истраживања

У оквиру израде предложене докторске дисертације биће коришћени следећи експериментални поступци, методе и технике:

Добијање носача биокатализатора

Бентонит богат минералом смектитом биће модификован различитим методама. Након хидросепарације добија се фракција честица пречника $\leq 2\mu\text{m}$, додатно обогаћена смектитом. Добијена фракције биће коришћена у даљој синтези различитих носача:

- добијање натријумски измењеног смектита (Na-смектита);
- уградња полихидрокси катјона алуминијума и гвожђа у међуламеларни простор Na-смектита (пиларење);
- модификација киселином полазног и пилареног узорка;
- уградња хитозана у међуламеларни простор Na-смектита и киселином модификованог узорка.

Продукција и пречишћавање рекомбинантних ензима

- течна ферментација (SmF-od eng. submerged fermentation) и производња у лабораторијском ферментору гајењем експресионих ћелија *Escherichia coli* 10 β , BL21, BL21AI, C43 у зависности од плаزمида који има инсертовани жељени ген за продукцију одговарајућег ензима;
- пречишћавање ензима коришћењем класичних биохемијских техника (лиза ћелија, ултрафилтрација, преципитација, хроматографија) по потреби.

Карактеризација носача биокатализатора

- хемијски састав узорака биће одређен методом индуктивно спрегнуте плазме (ICP-OES) уз претходну деградацију силикатне структуре узорака помоћу микроталасне дигестије;
- елементарна анализа биће коришћена код узорака који садрже хитозан;
- инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом – техником KBr пастиле (eng. Fourier transform infrared spectroscopy – KBr pellet technique);
- рендгено-структурна дифракција праха (eng. X-ray powder diffraction – XRPD) биће коришћена за одређивање фазног састава;
- скенирајућом електронском микроскопијом (SEM) биће одређена морфологија честица испитиваних узорака;
- нискотемпературна физисорпција азота биће коришћена за одређивање специфичне површине ($S_{\text{ВЕТ}}$), запремине и расподеле величина пора у микро- и мезопорозној области.

Карактеризација биокатализатора

- принос имобилизације, ефикасност имобилизације;
- ензимска активност у имобилизату;
- рН и температурни оптимум имобилизата;
- рН, термичка и оперативна стабилност имобилизата;
- одређивање кинетичких параметара имобилизата;
- могућност рецикулације и складиштења;
- праћење настајања производа, биоактивних молекула, стандардним аналитичким методама, TLC, HPLC, спектрофотометријом и одређивањем антиоксидативних својстава.

5. Очекивани научни допринос

Научни допринос ове докторске дисертације огледа се у добијању имобилизата гликозидних хидролаза на модификованим смектитима и њиховој потенцијалној примени у прехранбеној индустрији. Планирана истраживања даће значајан научни допринос, при чему се може издвојити следеће:

- Синтетисаће се нови носачи биокатализатора на бази модификованих смектита на које ће се имобилисати изабране гликозидне хидролазе;
- Утврдиће се физичко-хемијска својства носача и биокатализатора;
- Побољшаће се перформансе овако добијених биокатализатора у односу на нативне ензиме – поспешиће се термичка и оперативна стабилност, стабилност током складиштења и показати могућност вишеструке употребе, односно рецикулације у реакцији од практичног значаја (хидролиза скроба, ксилана и лигноцелулозног материјала).

6. План истраживања и структура рада

Предметна докторска дисертација ће бити реализована у пет фаза:

- 1) синтеза носача на бази модификованих смектита;
- 2) потпуна физичко-хемијска и морфолошка карактеризација носача;
- 3) испитивање капацитета носача за везивање гликозидних хидролаза (комерцијалних и произведених α -амилаза, ксиланаза), испитивање приноса и ефикасности имобилизације и дефинисање оптималних парова носач-ензим;
- 4) испитивање стабилности, могућности поновне употребе и складиштења овако добијених имобилизата, праћење настајања производа ензимске реакције;

- 5) испитивање могућности увећања размера процеса за потенцијалну примену у хидролизи скроба и разградњи модел супстрата – ксилана из буковог дрвета, али и отпадног лигноцелулозног материјала (пшеничне плевне).

Докторска дисертација ће имати следећа поглавља: *Увод*, *Литературни преглед* (преглед досадашњих истраживања у вези са структуром смектита, условима њихових модификација и добијених својстава; продукцији, структури и примени гликозидних хидролаза; ензимској имобилизацији на различитим неорганским материјалима), *Експериментални део* (синтеза носача биокатализатора, методе испитивања физичко-хемијских својстава носача, методе продукције и пречишћавања рекомбинантних ензима, методе карактеризације биокатализатора у погледу приноса и ефикасности имобилизације, температурних и рН оптимума, одређивања кинетичких параметара, могућности рецикулације и складиштења као и праћење настајања биоактивних молекула као производа ензимске реакције), *Резултати и дискусија* (приказ свих резултата који се односе на структурно-морфолошка и текстуална својства носача и биокатализатора и њихово повезивање са понашањем у процесу ензимске имобилизације), *Закључци* и *Литература*.

7. Закључак и предлог

На основу података о досадашњем научно-истраживачком раду и постигнутим резултатима, Комисија сматра да кандидаткиња **Вишња Д. Косић, мастер инжењер биотехнологије**, испуњава све услове за рад на предложеној теми докторске дисертације предвиђене Правилником о докторским академским студијама Технолошко-металуршког факултета. Такође, Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације под називом: **Добијање и карактеризација имобилизата индустријски значајних гликозидних хидролаза на модификованим смектитима** научно утемељена. Истраживања у овој дисертацији припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, да кандидаткињи **Вишњи Д. Косић** одобри израду докторске дисертације под наведеним насловом. За менторе се предлажу: **др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор** Технолошко-металуршког факултета и **др Александра Милутиновић Николић, научни саветник** Института за хемију, технологију и металургију.

У Београду, 22.06.2023.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Александра Милутиновић-Николић, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за хемију, технологију и
металургију-Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Наташа Божић, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за хемију, технологију и
металургију-Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Душан Мијин, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет