

Факултет Технолошко-металуршки

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/70

(Број захтева)

12.4.2024.

(Датум)

Веће научних области техничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев упућује)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуке о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и о именовању комисије за одбрану

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

КАНДИДАТ Марко (Милорад) Јонових

(име, име једног од родитеља и презиме)

студент докторских студија на студијском програму : Хемијско инжењерство

пријавио је докторску дисертацију 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

Технолошко инжењерство

из научне области:

Универзитет је дана 23.1.2023. својим актом под бр. 61206-171/1-23 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

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

Име и презиме ментора: др Зорица Кнежевић Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет
и др Бранко Бугарски, редовни професор у пензији Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Комисија за оцену докторске дисертације именована је на седници одржаној 26. 12. 2023. одлуком факултета под бр. 35/311, у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	Др Соња Јаковетић	доцент	Биохемијско инжењерство и биотехнологија	ТМФ
2.	Др Верица Ђорђевић	научни саветник	Хемијско инжењерство	ТМФ
3.	Др Никола Милашиновић	редовни професор	Хемијско инжењерство, Хемија	Криминалистичко-полицијски Универзитет у Београду

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Датум стављања извештаја Комисије и докторске дисертације на увид јавности 11. 3. 2024.

Наставно-научно веће факултета усвојило је извештај Комисије за оцену докторске дисертације на седници одржаној дана 11. 4. 2024.

Комисија за одбрану докторске дисертације именована је на седници одржаној 11. 4. 2024.

одлуком факултета под бр. 35/68, у саставу:

	Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1.	Др Соња Јаковетић Танасковић	доцент	Биохемијско инжењерство и биотехнологија	ТМФ
2.	Др Милена Жужа Праштало	научни сарадник	Биохемијско инжењерство и биотехнологија	Институт за медицинска истраживања
3.	Др Верица Ђорђевић	научни саветник	Хемијско инжењерство	ТМФ
4.	Др Никола Милашиновић	редовни професор	Хемијско инжењерство, Хемија	Криминалистичко- полицијски Универзитет у Београду

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

др Петар Ускоковић, редовни професор

- Прилози:
1. Одлука Наставно-научног већа о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и одлука о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације
 2. Извештај Комисије о оцени докторске дисертације
 3. Примедбе на извештај Комисије о оцени докторске дисертације (уколико их је било) и мишљење Комисије о примедбама

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

ДIⅣa

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. 52. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 11.4.2024. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата о оцени докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије у саставу: др Соња Јаковетић Танасковић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, др Верица Ђорђевић, научни саветник Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет и др Никола Милашиновић, редовни професор Криминалистичко-полицијског Универзитета у Београду, о прегледу и оцени урађене докторске дисертације 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“** коју је поднео **Марко Јонових**, дипломирани инжењер технологије и упућује се на сагласност Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Веће научних области техничких наука Универзитета у Београду дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације Марка Јоновиха, 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“** Одлуком број: 61206-171/2-23 од 23. 1. 2023. године.

Верификација научних доприноса:

Категорија M21:

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>

Категорија M22:

1. 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>

Одлуку доставити: Већу научних области техничких наука Универзитета, ментору, Служби за наставно-студентске послове и Архиви факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

ДV

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. 52. Правилника о докторским студијама ТМФ, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 11. 4. 2024. године, донета је

О Д Л У К А

о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације

Именује се Комисија за одбрану докторске дисертације **Марка Јоновиха**, дипломирани инжењер технологије, са темом 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**“, у саставу:

1. Др Соња Јаковетић Танасковић, доцент Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет,
2. Др Милена Жужа Праштало, научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за медицинска истраживања,
3. Др Верица Ђорђевић, научни саветник Универзитета у Београду, Технолошко-металуршког факултета,
4. Др Никола Милашиновић, редовни професор Криминалистичко-полицијског Универзитета у Београду.

Одлуку доставити: Одлуку доставити: члановима Комисије, Универзитету у Београду, Служби за наставно-студентске послове и Архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Марка (Милорад) Јоновића**, дипл. инж. технол.

Одлуком бр. 35/311 од 26.12.2023. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Марка (Милорад) Јоновића**, дипл. инж. технол. под насловом

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

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

- Школске **2013/2014.** године кандидат Марко (Милорад) Јоновић, дипл. инж. технологије је уписао докторске студије, на студијском програму Хемијско инжењерство, на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду. Испите на докторским студијама положио је са просечном оценом 9,67. Због истека рока за завршетак уписаних студија, школске **2022/2023.** године је поново уписао докторске студије, на студијском програму Хемијско инжењерство, на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду.
- 22.11.2022.** године на седници Наставно-научног већа донета је одлука бр. 35/270 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Марка (Милорад) Јоновића, дипл. инж. технологије 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.*
- 29.12.2022.** године на седници Наставно-научног већа донета је одлука бр. 35/329 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације Марка (Милорад) Јоновића, дипл. инж. технол. 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*, а за менторе ове докторске дисертације именовани су др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, и др Бранко Бугарски, редовни професор у пензији Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

- **23.01.2023.** године на седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду донета је одлука бр. 61206-171/2-23 о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације Марка (Милорад) Јоновиха, дипл. инж. технол. 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.*
- **26.12.2023.** године на седници Наставно-научног већа Технолошког-металуршког факултета Универзитета у Београду донета је одлука бр. 35/311, о именовању Комисије за оцену докторске дисертације Марка (Милорад) Јоновиха, дипл. инж. технол. 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.*

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Хемијско инжењерство, као и Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду. Ментори су др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, и др Бранко Бугарски редовни професор у пензији Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, чије су компетенције за вођење докторске дисертације потврђене на основу искуства и објављених публикација из области којима дисертација припада.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Марко (Милорад) Јонових, дипл. инж. технол. рођен је 26.06.1986. године у Зајечару. У Бору је завршио основну школу 9. српска ударна бригада 2001. године и гимназију Бора Станковић 2005. године. Дипломирао је на Технолошко-металуршком факултету у Београду, на катедри за Органску хемијску технологију и полимерно инжењерство. Дипломски рад под називом *Екстракција угљен (IV)-оксидом из матичњака (Melissa officinalis) - кинетика процеса и математичко моделовање* одбранио је 27.09.2013. године. Школске 2013/2014. године је уписао докторске студије, на студијском програму Хемијско инжењерство, на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду. 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*. Због истека рока за завршетак уписаних студија, школске 2022/2023. године је поново уписао докторске студије, на студијском програму Хемијско инжењерство на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду. 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. Од јуна 2021. ради као стручни 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. У 2024. години руководи пројектом из програма Доказ концепта под називом: *Омекиивач за рубље са биоцидним дејством* у трајању од 6 месеци. Области истраживања Марка Јоновиха су ензимско инжењерство, примена имобилисаних ензима у третману отпадних вода, као и ензимска хидролиза протеина. Од 2013. године је лиценцирани саветник за хемикалије. Први аутор је на једном раду категорије М21 и једном раду М22, као и два саопштења са међународне конференције у категоријама М33 и М34, који су произашли из рада на докторској дисертацији. Као коаутор, до сада је учествовао у изради и објављивању једне патентне

пријаве на националном нивоу M94, једног рада категорије M22, два саопштења са међународне конференције штампана у целина M33, који су такође везани за област докторске дисертације.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Марка (Милорад) Јоновића, дипл. инж. технол. 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*, написана је на 404 стране (од којих је 393 стране нумерисано), у оквиру којих се налази 11 поглавља, 98 слика, 20 табела, списак скраћеница, списак слика, списак табела, 1015 литературних навода и Прилог 1. Докторска дисертација садржи 6 целина: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литературу. На почетку дисертације дати су изводи на српском и енглеском језику. На крају дисертације дата је Биографија кандидата, као и Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада, Изјава о коришћењу и Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације. По својој форми и садржају, поднети рад задовољава све стандарде Универзитета у Београду за докторску дисертацију.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводном делу** докторске дисертације, образложен је проблем који се решава овом дисертацијом, односно истакнут је значај проналажења ефикасне методе имобилизације индустријски значајних ензима, протеаза и пероксидаза, како би се повећала њихова стабилност и развио економичан биопроцес, на основу чега су постављене и полазне хипотезе. Наведен је очекивани научни допринос дисертације у решавању овог проблема, заједно са методама које су коришћене. Посебно је истакнут допринос ове дисертације у унапређењу методе за синтетисање микронских и субмикронских честица калцијум-алгината ултразвучним распршивањем, као и метода имобилизације пероксидазе на магнетит-алгинатне честице.

Теоријски део подељен је на 4 потпоглавља. **Прво потпоглавље под називом *Индустријски ензими*** дели се на 6 потпоглавља и фокус је на значају и употреби ензима у савременим индустријским процесима. Посебан акценат стављен је на две врсте ензима: протеазе и пероксидазе. Детаљно су објашњене основне карактеристике ових ензима, њихова класификација на основу различитих критеријума, као што су структура активног места, оптимална рН вредност и специфичности према супстрату, функције ензима, примена као и најважнији извори из којих се добијају. Посебна пажња посвећена је препарату серинске ендопептидазе, под комерцијалним називом Алкалаза (Alcalase®, Novozymes Denmark). У наставку је истакнут значај примене протеаза у прехранбеној индустрији, са посебним освртом на ензиме који се користе у модификацији протеина хране с циљем побољшања њихових функционалних својстава. Наведени су и најважнији фактори и објашњен је њихов утицај на који утичу на ефикасност ензимске хидролизе протеина. Објашњен је принцип различитих метода које се користе за квантификацију степена хидролизе протеина, као што су рН-стат, тринитробензенсулфонска метода (TNBS), *o*-фталдиалдехидна (OPA) и трихлорсирћетна метода (TCA). Након тога дата је детаљна анализа структуре и хемије протеина у храни, са посебним освртом на протеине из соје и беланцета, који су предмет докторске дисертације. У наставку се описују структура, класификација, механизам деловања ових ензима као и њихова функција са посебним освртом на фундаменталну улогу пероксидаза у антиоксидативним процесима код различитих врста организама, укључујући бактерије и биљке. У наставку је детаљно описана пероксидаза из рена, њена структура, функција и

механизам деловања. Описана је улога овог ензима у биолошким системима и примена у различитим областима укључујући дијагностику, прехранбену индустрију и третман отпадних вода. **Друго потпоглавље под називом *Боје***, које је подељено на три потпоглавља, бави се историјом, класификацијом и применом боја. Детаљно су описане различите класе синтетичких боја, њихове хемијске структуре, круцијална својства, као и примена у текстилној индустрији за процесе као што су бојење, штампање и завршна обрада. На крају поглавља фокус је на две антрахинонске боје, *C.I. Acid Blue 225 (AB225)* и *C.I. Acid Violet 109 (AV109)* за свилу, вуну и најлон, које су коришћене у експериментима. Након тога описан је утицај боја на животну средину и третман обојених отпадних вода. Анализиран је механизам и ефикасност различитих процеса који се користе за уклањање боја из отпадних вода текстилне индустрије, као што су физички, хемијски и биолошки процеси. Описана су два главна механизма биооксидационих процеса. Разматрани су фактори који утичу на ефикасност биооксидационих процеса, при чему је истакнуто да је концентрација боја у отпадној води један од најважнијих фактора. Представљени су резултати бројних истраживања која су показала да биооксидациони процеси могу да буду ефикасни у уклањању боја из отпадних вода текстилне индустрије. **Треће потпоглавље под називом *Имобилизација ензима*** даје преглед научне литературе о имобилизацији ензима, који садржи релевантне информације о методама, материјалима и својствима имобилисаних ензима. Описане су предности и недостаци имобилисаних ензима, укључујући њихову поновну употребу, стабилност, продуктивност, као и кључни фактори који утичу на активност имобилисаних ензима, укључујући интеракције ензима и носача, ограничења преноса масе и конформационе промене. Поглавље говори и о потенцијалној примени имобилисаних ензима у различитим индустријама, укључујући прехранбену, фармацеутску и текстилну. Након тога се у поглављу описују различити типови имобилизације ензима попут иреверзибилне и реверзибилне методе. У овом поглављу се налази преглед различитих материјала који се могу користити као носачи за имобилизацију ензима. Носачи за имобилизацију ензима се могу класификовати у две главне групе: класичне и новосинтетисане носаче и у раду су описане њихове предности и недостаци. Ово поглавље пружа детаљан увид у хемијску структуру, изворе и особине алгината, природног полисахарида са широким спектром примена. Дат је преглед метода за формирање хидрогела са посебним акцентом на методе за добијање честица алгината, односно електростатичку екструзију и ултразвучно распршивање. У овом поглављу се описује и употреба нових функционализованих материјала као носача за имобилизацију ензима у биокатализи. Представљене су предности ових материјала у односу на традиционалне, као што су побољшана активност ензима, лакше издвајање из реакционих смеша и смањење дифузионих лимитација, термичка и хемијска стабилност, добра механичка својства и способност формирања различитих морфолошких облика, посебно на нано нивоу. Посебан акценат је стављен на хибридне и композитне материјале, који комбинују својства и предности органских и неорганских носача, чиме се омогућава боља контрола процеса и повећана ефикасност имобилисаних ензима. Детаљно се разматра улога и примена магнетних наночестица, посебно оксида гвожђа, у одвајању биокатализатора из реакционих смеша и њихове карактеристике као што су велика површина и хидроксилне групе за ефикасно везивање ензима. Поглавље такође детаљно описује методе синтезе магнетних наночестица, наглашавајући важност контролисања величине честица и спречавања агрегације. Посебна пажња је посвећена синтези магнетних наночестица, методом копреципитације, као и стабилизацији ових честица. **Четврто потпоглавље под називом *Ензимска кинетика*** детаљно описује ензимску кинетику, односно факторе који утичу на брзину ензимске реакције, попут концентрације супстрата, температуре, рН вредности и присуства инхибитора, али и наглашава значај ензимске кинетике приликом утврђивања механизма ензимске реакције. Објашњен је значај континуалног праћења ензимске реакције и недостатак мерења брзине у једној тачки. У почетку је дат преглед кинетике стационарног стања и Михаелис-Ментенове (*Michaelis-Menten*) једначине и објашњен је значај кинетичких константи попут Михаелисове константе (K_m) и каталитичке константе (k_{cat}). У наставку је пружен детаљан преглед метода

за одређивање кинетичких константи. У даљем тексту разматрана је кинетика реверзибилних ензимских реакције као и кинетика и одређивање кинетичких константи у реакцијама у којима долази до инхибиције ензима, било да је реч о инхибицији производом, супстратом у вишку или инхибиторима присутним у реакционој смеши. Представљена је Диксонова (*Dixon*) метода за одређивање кинетичких константи и потврда механизма инхибиције. У даљем тексту анализиране су ензимске реакције са два компетитивна супстрата. Поглавље обухвата и кинетику реакција са више супстрата, представљајући јединствене шеме и кинетичке једначине са насумичним, правилним и *тзв.* пинг-понг механизмом. Методологија анализе укључује и њихове кинетичке константе, пружајући дубок увид у међусобне интеракције у овим сложеним ензимским системима. У овом поглављу је даље детаљно описана зависност активности и стабилности ензима од рН вредности и температуре. Описана је и кинетика имобилисаних ензима, истичући њихов значај у биотехнолошким процесима. Објашњен је утицај носача за имобилизацију на дифузију супстрата и производа у микрооколини биокатализатора. Даље се говори о томе како ковалентна модификација функционалних група укључених у каталитички механизам може утицати на механизам реакције и доступност активног места. Објашњена је разлика између спољашњег и унутрашњег преноса масе и дифузионих ограничења. Уведен је концепт *Thiele*-овог модула, који указује на однос између брзина реакција и транспорта у систему. На крају поглавља, представљене су софтверске опције за анализу кинетичких података.

Експериментални део дисертације подељен је на два поглавља. У **првом потпоглављу Материјали** детаљно су приказани сви материјали коришћени у изради дисертације. **Друго потпоглавље Методе** је посебна целина експерименталног дела дисертације у оквиру које су детаљно приказане све методе које су примењиване у току експерименталног рада, према редоследу експерименталног рада као и начини обраде резултата. Почетак овог дела описује методологију коришћену у добијању калцијум-алгинатних микронских и субмикронских честица, магнетит-алгинат честица, као и за карактеризацију тих честица. Описане су детаљно методе добијања калцијум-алгинатних микрочестица електростатичком екструзијом, калцијум-алгинатних субмикронских честица ултразвучним распршивањем, магнетних честица копреципитацијом FeCl_3 и FeSO_4 у амонијачном раствору и магнетит-алгинат честица (МАО) електростатичком екструзијом. Карактеризација честица урађена је мерењем величине и зета потенцијала алгинатних микрочестица и субмикронских честица, механичким испитивањем чврстоће магнетит-алгинатних честица компресијом, магнетном карактеризацијом магнетита и магнетит-алгинатних честица, одређивањем степена бубрења носача, испитивањем морфологије површина скенирајућом електронском микроскопијом (SEM). Анализа инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовим трансформацијама (FTIR) коришћена је за потврђивање хемијских интеракција и промена у хемијском саставу и структури након имобилизације, а одређивање концентрације протеина рађено је методом по Бредфорду (*Bradford*). Након добијања и карактеризације честица које су коришћене у раду, описана је оптимизација методе за имобилизацију алкалазе на калцијум-алгинатне честице при чему су варирани кључни параметри имобилизације (концентрација алкалазе, рН вредност и моларитет Tris-HCl реакционог пуфера, време активације носача за имобилизацију, маса карбодиимида (EDAC) потребна за активацију носача, време имобилизације, концентрација алгината, утицај сушења на добијање субмикронских алгинатних честица), док су као излаз праћени садржај протеина и активност имобилисаног биокатализатора. Активност слободне и имобилисане алкалазе одређена је стандардном методом која користи азоказеин као супстрат. Описана је метода у којој се добијени биокатализатори (алкалаза ковалентно везана на алгинатне честице или инкапсулирана у магнетит/алгинатне честице) примењују у хидролизи протеина соје и беланцета при чему се степен хидролизе одређује стандардним методама и то рН стат и TNBS методама. Испитана је кинетика реакције са слободним и имобилисаним ензимом и одређене су кинетичке константе на основу чега су расветљене разлике у механизмима реакција са слободним и имобилисаним ензимом. Даље, описана је оптимизација методе за имобилизацију пероксидазе из рена типа С (HRP-C) на МАВ честице. Ефикасност

имобилизације је праћена мерењем активности и масе везаног ензима. Активност слободне и имобилисане пероксидазе на магнетит-алгинат честицама (HRP-MAB) мерена је коришћењем пирогалолола као стандардног супстрата и упоређена је са активношћу слободног ензима. Најефикаснији имобилисани препарат примењен је у реакцији уклањања боја AB225 и AV109 при чему је описана оптимизација услова (иницијалне концентрације ензима (HRP-C), концентрације боја, иницијалне концентрације водоник-пероксида, масе HRP-MAB честица, односа магнетит/алгинат, пречника HRP-MAB честица, реакционе температуре и pH вредности раствора) за извођење ове реакције. Описане су и две друге методе имобилизације, ковалентна имобилизација на честице без магнетита и инкапсулација у алгинатне честице са магнетитом. Активност ензима у овим реакцијама праћена је мерењем апсорбанце на специфичним таласним дужинама за сваку боју. Истражена је почетна кинетика уклањања боја AB225 и AV109 коришћењем слободне пероксидазна магнетит-алгинат честицама. Коришћењем апликације *Enzyme Kinetics*, у OriginLab-овом *OriginPro 2022* софтверу обављена је оптимизација параметара, уз фокус на одређивање кинетичких константи за најмања одступања и одређивање оптималних реакционих услова. Дато је упутство за коришћење апликације, укључујући инсталацију, уношење података, фитовање модела и интерпретацију резултата.

У оквиру поглавља **Резултати и дискусија** ове докторске дисертације приказани су добијени експериментални резултати. Приказ добијених резултата обухвата и њихову анализу и дискусију која подразумева објашњење и поређење са литературним наводима сличне тематике. Ова целина се дели на пет поглавља: 1) Карактеризација добијених честица; 2) Оптимални услови за имобилизацију алкалазе на калцијум-алгинатне честице, 3) Примена имобилисане алкалазе за хидролизу протеина из хране у реалном реакционом систему; 4) Оптимални услови за имобилизацију HRP на MAB честице; и 5) Примена HRP-MAB честица за уклањање антрахинонских боја AB225 и AV109. **Прво потпоглавље Карактеризација честица** пружа детаљан преглед методологије и резултата истраживања повезаних са производњом и карактеризацијом честица. Различите методе примењене су за добијање честица, а посебан акценат стављен је на производње честица са аспекта могућности везивања ензима алкалазе и пероксидазе из рена (HRP-C). Резултати истраживања обухватају честице различитих димензија које су добијене коришћењем више техника, укључујући електростатичку екструзију и ултразвучно распршивање. Методе производње честица укључивале су дисперговање суспензије натријум-алгината и магнетита у фине капљице, и њиховог накнадног очвршћавања хемијским умрежавањем. Варирањем пречника игле постигнуте су честице различитих величина, док је применом електростатичке екструзије било могуће добити честице пречника испод 2 μm . Субмикронске алгинатне честице добијене су ултразвучним распршивањем. Утврђено је да везивање ензима на честице проузрокује смањење зета потенцијала, спречавајући агрегацију и адхезију честица. Сушење аеросола током процеса ултразвучног распршивања резултирало је субмикронским честицама. Након имобилизације ензима дошло је до повећања и микронских и субмикронских честица због формираног слоја ензима. Оптички микроскопски прикази честица показали су сферичне облике и агрегате наночестица магнетита у њима, док је везивање ензима значајно утицало на облик честица и то на смањење сферичности и измене морфологије честица. Различите морфолошке карактеристике површине уочене су на SEM сликама, наглашавајући разлике између честица са и без ензима. Такође је уочено смањење величине честица након сушења, са знатно већим смањењем код честица без везаног ензима. Механичке особине честица и њихов модул еластичности испитивани су тестовима сабијања при чему није уочена значајна разлика међу узорцима са различитим односима магнетита и алгината. Како су магнетна својства од изузетног значаја за ефикасну сепарацију биокатализатора из реакционе смеше и поновну употребу, испитана су магнетна својства синтетисаних магнетних честица као и магнетних честица обложених алгинатом, MAB честицама. Магнетизационе криве показују добра магнетна својства обе врсте честица и испоставило се да обе криве имају малу реманентност и коерцитивност у хистерезним петљама, показујући добра магнетна својства.

Магнетне честице као и магнетит-алгинат честице су имале добру дисперзибилност у води и брз магнетни одговор пошто су биле одвојене из суспензије спољним магнетом у року од 1 мин, али је утврђено и значајно смањење магнетизације засићења код МАВ честица, што се повезује са додатним алгинатним слојем. FTIR анализом истраживане су интеракције функционалних група ензима, алгината и магнетита, нарочито је важна појава и интензитет пикова у *mzv*. области отиска прста ($1300\text{--}650\text{ cm}^{-1}$), што посебно идентификује интеракције између алгината, HRP-C и Ca^{2+} . Промене у FTIR спектру HRP-MAВ честица одражавају успешно инкапсулирање магнетитних честица у алгинат и везивање HRP-C. Ово поглавље детаљно описује структуру и карактеристике произведених честица, пружајући фундаменталне информације о њиховој морфологији, магнетним својствима и интеракцијама на молекулском нивоу. **Друго потпоглавље Оптимални услови за имобилизацију алкалазе на калцијум-алгинатне честице** истиче значај оптималних услова имобилизације за постизање ковалентног везивања алкалазе на честице алгината. Посебан нагласак стављен је на испитивање утицаја односа ензима и носача на масу везаног ензима на носач и принос имобилизације. Даље су за оптимални однос ензима и носача варирани остали параметри и то: почетна концентрација ензима, рН вредност пуфера, моларитет пуфера, време активације EDAC-ом, масени однос активирајући агенс EDAC/носач, и време имобилизације. Највећа активност код алгинатних честица добијених електростатичком екструзијом постигнута је са почетном концентрацијом ензима од $0,53\text{ IU/cm}^3$ (10 cm^3), 50 mM Tris-HCl пуфером рН вредности 8,5, временом активирања од 30 минута са 10 mg EDAC-а на $0,5\text{ g}$ алгинатних микрочестица и временом имобилизације од 20 часова. Приказани су приноси имобилизације и упоређени са резултатима других релевантних студија. Истакнуто је да је ово једна од ретких студија у којој је коришћен Tris-HCl уместо фосфатног пуфера, како би се избегао један од главних недостатака алгината, а то је да је осетљив на хелаторе калцијума попут фосфатних јона. Затим је фокус сављен на имобилизацију алкалазе на алгинатне субмикронске честице добијене ултразвучним распршивањем са сушењем (UAD) и без сушења (UA) при горе наведеним оптималним условима. Истакнут је значај концентрације алгината на умрежавање полимера и активност ензима. Најактивније су биле честице добијене са $0,4\%$ (w/v) алгинатом са сушењем. Алкалаза је имобилисана и на трећи тип носача и то МАВ честице синтетисане електростатичком екструзијом при односу алгината и магнетита 4:1. Сви добијени биокатализатори су упоређени са аспекта везане активности по маси носача и упоређени са литературно доступним подацима. **У трећем потпоглављу**, први део истраживања, анализирао је примену синтетисаних имобилизата у реалним системима за хидролизу протеина из беланцета и изолата соје. Сличности и разлике у резултатима добијеним са различитим типовима носача за имобилизацију и односима ензима и супстрата (E/S) представљени су кроз степен хидролизе (DH) као функција времена. Резултати илуструју значај типа честица и супстрата на кинетику реакције, са највишим степеном хидролизе постигнутим коришћењем алкалаза-UAD честица. Други део поглавља фокусира се на одређивање кинетичких параметара реакција хидролизе протеина изолата соје и беланцета коришћењем слободне и имобилисане алкалазе. Представљени су резултати карактеризације начина имобилизације и утицаја на кинетику реакције. Употреба математичких модела за описивање почетне кинетике истражује се у контексту различитих супстрата и типова честица. У последњем делу поглавља разматрана је примена имобилисане алкалазе у реалним системима, с обзиром на могућности рециклирања и стабилности биокатализатора. Одрађена је економска оправданост коришћења имобилисаних ензима у односу на слободне, на основу праћења стабилности и активности биокатализатора у више циклуса. Представљени су резултати који демонстрирају стабилност имобилисане алкалазе на UAD честице током осам узастопних циклуса хидролизе протеина изолата соје. Овај део текста пружа увид у значај имобилизације алкалазе за хидролизу протеина из различитих супстрата. **У четвртном потпоглављу** обухваћена је производња и имобилизација биокатализатора са ковалентно везаном HRP-C на МАВ честице. Уводни део поглавља описује како је изведена ковалентна имобилизација HRP-MAВ честица. Описана је хемија ковалентне имобилизације коришћењем

карбодиимида, EDAC-а, као активатора. Приказан је процес формирања амидне везе и стварања међупроизвода попут О-ацилизоурее. Испитана је ефикасност имобилисаног ензима у стандардној реакцији са пирогалолом и у реалном систему са синтетским бојама као супстратом. Параметри који су испитани у односу на активност ензима и ефикасност имобилизације су почетна концентрација ензима, утицај величине МАВ честица, масеног односа магнетита и алгината и почетног односа ензима и носача на ефикасност имобилизације и активност HRP-МАВ биокатализатора. Активност имобилисаног ензима мерена је његовом способношћу да оксидује пирогалол у присуству водоник-пероксида. Највећа ефикасност имобилизације (принос и укупан садржај везаних протеина) и активност HRP-МАВ честица постигнута је са најмањим МАВ честицама, односом магнетита и алгината 1:4, почетном концентрацијом HRP-C од 2,5 mg/g носача и времену имобилизације од 20 сати. Ковалентно везивање HRP-C на МАВ честице повећало је његову стабилност на вишим температурама у поређењу са слободним ензимом. HRP-МАВ честице су задржале 38,3% активности слободне HRP-C, што је вероватно последица ограниченог преноса масе у хетерогеном систему и промена у микроокружењу ензима. Испитан је утицај pH вредности и температуре на активност HRP-МАВ честица и упоређен са слободном HRP-C. Оптимална температура за HRP-МАВ честице је била нижа (35 °C) од оптималне температуре за слободни ензим (45 °C), али је оптимална pH вредност померена ка базној средини (pH вредност 9) у поређењу са слободним ензимом (pH вредност 7). **Пето поглавље** описује коришћење HRP-МАВ честица за уклањање антрахинонских боја АВ225 и АВ109 из отпадних вода. Испитивани су различити фактори који утичу на ефикасност уклањања боје, укључујући величину честица, однос магнетит/алгинат, почетну концентрацију HRP-C, масу HRP-МАВ честица унетих у реакциону смешу, pH вредност раствора боје, температуру процеса и почетну концентрацију водоник-пероксида. Кинетика реакције је испитана мерењем почетне брзине реакције при различитим концентрацијама супстрата и инхибитора. Поновна употреба HRP-МАВ честица је испитана у седам циклуса уклањања боја. HRP-МАВ честице су ефикасно уклониле обе боје, постижући максимални проценат уклањања од 76,3% за АВ225 и 75,7% за АВ109 под оптималним условима. Величина честица, однос магнетит/алгинат, почетна концентрација HRP-C, маса честица, pH вредност раствора боје, температура процеса и почетна концентрација водоник-пероксида значајно утичу на ефикасност уклањања боје. Иmobилизација HRP-C на МАВ честице повећава стабилност ензима и омогућава његову поновну употребу. Међутим, каталитичка активност се смањује након сваког циклуса поновне употребе делимично због спирања ензима са носача и делимично због акумулације производа реакције и непрореаговалог супстрата на носачу у микрооколини ензима. HRP-МАВ честице показују већи афинитет према АВ109 него АВ225. Механизам уклањања боје за обе боје највероватније следи несеквенцијални пинг-понг би-би механизам. Боја и водоник-пероксид делују као инхибитори у реакцији уклањања боје, а њихов инхибициони утицај зависи да ли је HRP-C слободна или имобилисана на МАВ честицама.

У поглављу **Закључак**, сумирани су најзначајнији резултати и сазнања проистекли из ове докторске дисертације, са акцентом на могућу комерцијалну употребу.

У поглављу **Литература**, наведене су све референце цитиране у докторској дисертацији као и радови проистекли током израде ове дисертације.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

2019. године усвојен је Европски зелени план чији је циљ да се Европа учини климатски неутралном до 2050. године. Овај план треба да подстакне развој зелене технологије и створи одрживу индустрију уз смањење загађења. Акценат је на проналаску алтернативних технологија које треба да задовоље потребе за производима растуће светске популације, уз

мању потрошњу природних ресурса и смањен утицај на животну средину. Развој биотехнолошких, а нарочито ензимских технологија омогућава транзицију ка чистијој индустријској производњи захваљујући јединственим особинама ензима. Ензими су биолошки катализатори које карактерише висока специфичност, при чему се реакције катализоване ензимима одвијају под блажим реакционим условима у односу на класичне хемијске реакције. Уз то су биодеградабилни и нетоксични, па самим тим развој ензимских процеса, као еколошки прихватљивих, све више добија на значају. Међутим, висока цена производње и релативно ниска стабилност у поређењу са класичним катализаторима ограничавају њихову комерцијалну употребу. Један од приступа за превезилажење ових проблема је и имобилизација ензима, у чему се и препознаје оригиналан научни допринос ове докторске дисертације. Имобилизацијом ензима, омогућава се њихова поновна употреба, а правилним одабиром метода имобилизације и носача, могуће је значајно повећати стабилност, селективност и специфичност примењеног ензима. У овом рад развијене су нове методе имобилизације два индустријски значајна ензима, пероксидазе из рена (HRP) и протеазе из *B. licheniformis* (Алкалазе), како би се њихова комерцијална употреба учинила економичнијом. Пероксидаза је ензим који је препознат као потенцијални одговор у потрази за решењем загађења отпадних вода текстилне индустрије. Ове боје су јаки загађивачи због своје високе токсичности, а додатни проблем представљају и производи деградације ових боја у екосистему. Конзумација воде контаминираним бојом може изазвати низ штетних здравствених ефеката, попут проблема са дисањем, супресијом имунитета, поремећајима централног нервног система итд., па је од изузетног значаја омогућити разградњу ових боја до нетоксичних производа. Употреба пероксидаза за разградњу текстилних боја ограничена је њиховом ценом и ниском стабилношћу у присуству супстрата, водоник-пероксида, што значајно подиже цену целог процеса. У овом раду развијена је нова метода имобилизације пероксидазе на МАВ честице при чему је, за разлику од до сада понуђених решења, која подразумевају инкапсулацију ензима у хидрогел, ензим имобилисан ковалентном везом на површину алгинатних честица помоћу карбодиимида као активирајућег агенса. При томе су честице алгината добијене електростатичком екструзијом суспензије алгината и магнетита при одређеним односима. На овај начин спречено је отпуштање ензима из хидрогела током времена, док је издвајање биокатализатора из реакционе смеше значајно олакшано коришћењем екстерног магнетног поља или таложењем услед велике густине честица. Последњих деценија примећен је велики скок у броју људи који имају алергије на храну, нарочито на протеине из хране. Са друге стране, с порастом броја људи на планети и потреба за производњом протеина константно расте, и немогуће је заобићи соју или јаја као добре изворе протеина, а који су такође препознати као учестали алергени. Ензимском хидролизом протеини се преводе у неалергене хидролизате, који задовољавају све нутритивне потребе, а могу да поседују боља функционална својства од полазних протеина. Алкалаза је комерцијални препарат који је нашао широку примену у производњи протеинских хидролизата, при чему се имобилизацијом алкалазе омогућава њена поновна употреба и значајно унапређује економичност целог процеса. Ова дисертација даје научни допринос имобилизацији Алкалазе на алгинатне честице, при чему је ензим имобилисан ковалентно на честице калцијум-алгината користећи карбодиимид као активатор. Овај начин имобилизације доприноси решењу низа проблема који су присутни када се Алкалаза инкапсулира унутар алгинатних честица, нарочито ограничене дифузије кроз поре хидрогела до места имобилисаног ензима. Поред тога ова дисертација има допринос и у развоју нових метода синтезе алгинатних честица ултразвучним распршивањем. Увидом у изложено може се закључити да се ова докторска дисертација бави врло значајним истраживањима у области имобилизације ензима и да добијени резултати дају научни допринос у односу на тренутно стање у овој области. Савременост и оригиналност докторске дисертације потврђена је радовима кандидата публикованим у међународним часописима и саопштеним на међународним научним скуповима.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Током израде докторске дисертације кандидат је извршио детаљан преглед научне и стручне литературе из релевантних научних области везаних за проблематику докторске дисертације. Референтна литература садржи најновије радове из области имобилизације ензима, биокатализе, кинетике ензимских реакција, хидролизе протеина и разградње боја у различитим имобилисаним системима. Коришћене су и референце из стандардних дела из области биохемије, хемијског и биохемијског инжењерства, технологије хране и текстила, који су послужили докторанду као теоријска подлога и основа за методологију истраживања. Цитирано је 1014 литературних навода који су омогућила да се јасно представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Већину прегледане литературе чине радови публиковани у врхунским међународним часописима од стране еминентних стручњака у испитаној научној области. На основу овог пресека стања у литератури изложене су основне смернице за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из пописа литературе која је коришћена у истраживању, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати приказани у овој докторској дисертацији су добијени применом одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и обрадом података. Поступци испитивања оптималних услова имобилизације, хидролизе и уклањања боја су рађени по објављеним процедурама као и оригиналним методама оптимизованим у току експерименталног рада. Поред електростатичке екструзије, тестиран је и нови поступак за добијање алгинатних субмикронских честица, који се заснива на комбинацији ултразвучног дисперговања, сушења топлим ваздухом и желирања у колони са влажним зидовима. Наиме, честице алгината се добијају методом ултразвучне дисперзије раствора алгината, при чему ваздух који носи дисперговане полимер-аеросолне честице, у зависности од температуре и незасићености, у већој или мањој мери подстиче испаравање воде из њих и на тај начин смањује њихове величине, и тако добијене наночестице затим желирају у колони са навлаженим зидовима. Овако добијене наночестице коришћене су као носачи за имобилизацију алкалазе и упоређена су каталитичка својства овако добијених биокатализатора са имобилисаним системима у којима је носач добијен електростатичком екструзијом. За имобилизацију ензима коришћене су честице са најбољим карактеристикама (димензије, сферичност, расподела величина, магнетна својства, однос магнетита и алгината). Оптимизација ковалентне имобилизације ензима алкалазе на честице алгината и честице магнетита/алгината добијених електростатичком екструзијом и ултразвучним распршивањем представља другу фазу експеримената.. Протеолитичка активност алкалазе одређена је спектрофотометријски праћењем хидролизе хромогеног деривата казеина, азоказеина. Морфолошке карактеристике добијених честица са и без имобилисаног ензима анализиране су помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM). Одређена је величина честица као и морфологија површине магнетних честица са и без алгината. Да би се боље разумела природа потенцијално успостављених веза између ензима и носача, честице носача и имобилизата су окарактерисане инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовим трансформацијама (FTIR). Расподела величине честица и зета потенцијал су одређивани методом динамичког расејања светлости. Магнетна својства честица и јачина коерцитивног поља испитивани су применом SQUID магнетометрије (суперпроводни квантни интерферометар). Магнетна својства честица су упоређена на основу хистерезисних кривих за магнетне и магнетит/алгинат честице на температурама од 5 K и 300 K. Праћена је и активност слободне и имобилисане алкалазе у

реакцији хидролизе протеина из сојиног изолата и беланца у индустријски релевантним условима, односно у реактору са интензивним мешањем и у присуству нечистоћа на основу мерења потрошње калцијум-хидроксида за одржавање константне рН вредности током хидролизе. При хидролизи је коришћена тринитробензенсулфонска киселина, тзв. TNBS метода. Испитивана је стабилност имобилисане алкалазе, могућност њеног коришћења кроз неколико циклуса извођења реакција хидролизе протеина изолата соје и беланца у шаржном реактору уз механичко мешање и потенцијално задржавање активности након одређеног времена складиштења. Добијени резултати су коришћени у даљем развоју имобилисаног система са пероксидазом рена. Честице са најбољим карактеристикама (димензије, сферичност, дистрибуција величина, магнетна својства, однос магнетита и алгината) коришћене су за имобилизацију пероксидазе рена (HRP-C). Испитивани су утицаји времена имобилизације, масеног односа ензима и носача, концентрације активационог агенса на масу везаног ензима и специфичну активности добијеног биокатализатора. Испитана је стабилност имобилисане пероксидазе, као и могућност њеног коришћења кроз неколико циклуса извођења реакције оксидације две антрахинонске боје, AV109 и AB225. Кинетика реакције са слободним и имобилисаним ензимом испитивана је праћењем брзине реакције хидролизе протеина изолата соје и беланца, као и реакције уклањања антрахинонских боја, при различитим почетним концентрацијама супстрата и водоник-пероксида код реакције са HRP-C, док су кинетички параметри одређивани применом *Enzyme Kinetics* апликације програмског пакета *OriginPro 2022* фирме *OriginLab*.

3.4. Применљивост остварених резултата

Резултати ове дисертације поред научне вредности имају и потенцијал за индустријску примену у хидролизи протеина и биоремедијацији. Хидролиза протеина се може користити у различите сврхе, укључујући производњу пептида који су биолошки активни и аминокиселина. Ова једињења имају широку примену у разним гранама индустрије, нарочито у прехранбеној и фармацеутској. Поред употребе у производњи протеинских хидролизата, имобилисана протеаза се може користити и за уклањање протеина из млека, пива и других производа када се жели смањити алергеност производа или постићи неки други ефекат. У фармацеутској индустрији, се може користити за уклањање протеина из лекова и других производа. Поред тога овај биокатализатор може имати примену и у заштити животне средине у третману отпадних вода богатих протеинима, попут отпадних вода из токова млекара. Иmobилисана алкалаза на магнетит/алгинат микро- и субмикронским честицама након модификације површине и увођења функционалних група након активације карбодиимидом на магнетним честицама добијен у овој дисертацији има већу стабилност од слободног ензима, што у комбинацији са поновном употребом чини овај биокатализатор изузетно значајним за поменуте индустријске примене. У овој дисертацији та примена је потврђена на производњи хидролизата протеина беланца и соје, где су остварени високи степени хидролизе, чиме је потврђен индустријски потенцијал. Резултати овог истраживања обећавајући су и за примену у уклањању антрахинонских боја из раствора. Иmobилисана пероксидаза је показала високу ефикасност у уклањању ове врсте боја. Из приложеног се закључује да се овако добијен биокатализатор може ефикасно користити за заштиту животне средине, што је потврђено у реакцији уклањања антрахинонских боја AB225 и AV109. Поред горе наведених примена, резултати овог истраживања би могли бити применљиви и у другим областима.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

У свом досадашњем истраживачком раду, кандидат Марко (Милорад) Јонових, дипл. инж. технол. показао је самосталност и стручност у претраживању литературе, припреми и реализацији експеримената, коришћењу различитих техника карактеризације и анализи и обради резултата. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата, Комисија је

мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самосталан научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Пре свега треба поменути да први научни допринос ове дисертације представља систематски преглед литературе и критички осврт на досадашња истраживања у области синтезе алгинатних честица, магнетних честица и магнетних честица обложених алгинатом (МAB), али и поступака имобилизације два индустријски важна ензима и то алкалазе и пероксидазе. Свеукупно научни допринос ове дисертације је:

Развијање оригиналних метода:

- Развијена је оригинална метода за производњу субмикронских алгинатних честица ултразвучним распршивањем. У односу на досадашње стање у овој области, ова дисертација је донела две новине, и то сушење аеросола, чиме је омогућено формирање функционалних субмикронских честица из разблажених раствора алгината. Друга новина односи се на начин сакупљања честица помоћу колоне са влажним зидовима, чиме се превазилази проблем зачепљења колоне и формирања агломерата када алгинат није у облику аеросола.

Оптимизација и карактеризација имобилизације:

- Развијена је метода ковалентне имобилизације алкалазе на алгинатне честице, при чему је добијен биокатализатор повећане стабилности у односу на слободан ензим. Ово је искорак у односу на досадашње методе, које су углавном односе на имобилизацију алкалазе унутар алгинатних честица, што због специфичности самог ензима има низ недостатака. Пре свега супстрати су макромолекули па велики проблем представљају дифузионе лимитације, док са друге стране долази до отпуштања ензима из хидрогела што доводи до смањења броја циклуса у ком се ензим поново користи.
- Развијена је метода ковалентне имобилизације пероксидазе на МАБ честице. На овај начин омогућено је лако одвајање честица имобилизата коришћењем спољашњег магнетног поља, док је истовремено превазиђен проблем испирања ензима из носача.
- Потврђена је стабилност имобилисаних ензима (алкалаза и пероксидаза) током складиштења и могућност поновне употребе.

Примена имобилисаног ензима у реалним системима:

- Доказана је ефикасност имобилисаних ензима (алкалаза и пероксидазе) у реалним системима: хидролиза протеина беланца и изолата соје у шаржном реактору са механичким мешањем и уклањање антрахинонских боја из раствора. Уочено је да избор носача и тип честица утичу на активност и кинетичка својства имобилисаног ензима.
- Оптимизовани су процесни параметри у реакцији хидролизе сојиних протеина катализованом слободном алкалазом и алкалазом имобилисаном на одабране алгинатне честице.

Кинетичка анализа и механизам деловања:

- Дат је научни допринос разумевању механизма и кинетике ензимске хидролизе протеина соје и беланцета у различитим системима са имобилисаном алкалазом на алгинатним и магнетит/алгинат честицама.

- Дат је научни допринос разумевању механизма и кинетике ензимске разградње антрахинонских боја у различитим системима са имобилисаном пероксидазом, нарочито врстама и ефектима инхибиције.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације, у складу са полазним хипотезама, конципирана су након опсежне анализе литературе из имобилизације ензима и примене тако добијених биокатализатора у индустријски значајним процесима. Како би се остварили дефинисани циљеви, развијена је нова метода за производњу субмикронских алгинатних честица ултразвучним распршивањем, на које је ковалентно имобилисана алкалаза. Овако добијен биокатализатор је стабилнији од слободног ензима и може се користити у 8 циклуса, чиме се значајно повећава економичност процеса. Резултати кинетичке анализе у овом истраживању доприносе разумевању утицаја имобилизације и врсте супстрата на ток реакције хидролизе протеина. Утврђено је да су UAD субмикронске честице најбољи носач за имобилизацију алкалазе, јер се у реакцијама хидролизе протеина беланцета и изолата соје постиже највећи степен хидролизе. Посебна пажња посвећена је имобилизацији пероксидазе, због њеног значаја у биоремедијацији. Добијен је биокатализатор који ефикасно разграђује антрахинонске боје, АВ225 и АВ109, при чему је избор носача омогућио лако издвајање из реакционе смеше помоћу екстерног магнетног поља, чиме је значајно олакшана поновна употреба ензима, што је и показано применом у више циклуса. Кинетичка студија је дала значајан допринос у објашњењу механизма катализе и инхибиторног утицаја супстрата, чиме је омогућено пројектовање ефикасних биореакторских система. Из приложеног се види да је студија добро осмишљена и спроведена, са јасно дефинисаним циљевима и хипотезама. Методе су детаљно описане и резултати су статистички анализирани. Дискусија резултата је темељна и узима у обзир релевантну литературу, док су ограничења студије јасно истакнута уз предложене будуће правце истраживања.

Прегледом доступне литературе из ове области истраживања и резултата истраживања добијених у оквиру ове дисертације, може се закључити да добијени резултати представљају значајан допринос у области имобилизације и индустријске примене ензима.

4.3. Верификација научних доприноса

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) **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>

M33 – Саопштење са међународног скупа штампано у целини:

(3) **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**

M34 – Саопштење са међународног скупа штампано у изводу:

(4) **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:

(5) 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

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Марка (Милорад) Јоновиха, дипл. инж. технол., под називом Имобилисана протеаза и пероксидаза на магнетним микронским и субмикронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода, сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публикавањем резултата на конференцијама од међународног значаја. Такође, Комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом Имобилисана протеаза и пероксидаза на магнетним микронским и субмикронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода, кандидата Марка (Милорад) Јоновиха, дипл. инж. технол. прихвати, изложи на увид јавности и упути на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 8. 3. 2024.

Ментори:

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

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

Председник Комисије:

1. Др Соња Јаковетић Танасковић, доцент,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Чланови Комисије:

2. Др Верица Ђорђевић, научни саветник,
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

3. Др Никола Милашиновић, редовни професор,
Криминалистичко-полицијски Универзитет у Београду
