

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 08. 03. 2012. godine imenovani smo za članove Komisiju za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Milene Žuže, dipl. inženjera tehnologije, pod naslovom:

„RAZVOJ IMOBILISANIH SISTEMA SA PENICILIN-ACILAZOM IZ *Escherichia coli* ZA DOBIJANJE POLUSINTETSKIH PENICILINA“.

Posle pregleda doktorske disertacije, Komisija podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

I Z V E Š T A J
o urađenoj doktorskoj disertaciji

1. UVOD

Naslov i obim disertacije

Doktorska disertacija Milene Žuže, dipl. inž. tehnologije, pod naslovom: „Razvoj imobilisanih sistema sa penicilin-acilazom iz *Escherichia coli* za dobijanje polusintetskih penicilina“ napisana je na 291 strani, sadrži 125 slika, 19 tabela i 247 literaturnih navoda. Doktorska disertacija ima uobičajenu strukturu: Izvod (na srpskom i engleskom jeziku), Uvod (2 strane), Teorijski deo (98 strana), Eksperimentalni deo (30 strana), Rezultati i diskusija (125 strana), Zaključna razmatranja (4 strane), Literatura (24 strane) i Prilog (8 strana). Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde za doktorsku disertaciju.

Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- 28. 01. 2010. godine– na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je Odluka o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Milene Žuže, dipl. inž. tehnologije, pod naslovom: „Razvoj imobilisanih sistema sa penicilin-acilazom iz *Escherichia coli* za dobijanje polusintetskih penicilina“, a za mentora je imenovana dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor TMF.
- 26. 02. 2010. godine– na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Milene Žuže, dipl. inž. tehnologije, pod naslovom: „Razvoj imobilisanih sistema sa penicilin-acilazom iz *Escherichia coli* za dobijanje polusintetskih penicilina“.
- 08. 03. 2012. – na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je Odluka o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Milene Žuže, dipl. inž. tehnologije, pod naslovom „Razvoj imobilisanih sistema sa penicilin-acilazom iz *Escherichia coli* za dobijanje polusintetskih penicilina“.

Mesto disertacije u odgovarajućoj naučnoj oblasti

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti hemija i hemijska tehnologija za koju je matičan Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu.

Biografski podaci o kandidatu

Milena Žuža, diplomirani inženjer tehnologije, profil biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, rođena je 20. novembra 1980. godine u Sarajevu. Osnovnu školu „Josif Pančić“ i V beogradsku gimnaziju, prirodno-matematički smer, završila je u Beogradu sa odličnim uspehom. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala 1999. godine. U toku studija je 2003. godine boravila na stručnom usavršavanju u Nemačkoj, *Institut für Chemische*

Verfahrenstechnik, TU Clausthal-Zellerfeld. U toku studija je postigla izuzetan uspeh tako da je 2001. i 2004. godine dobila Nagradu za najbolje studente u generaciji od Fondacije „Panta S. Tutundžić“, a 2005. godine je dobila Specijalno priznanje za izuzetan uspeh u toku studija od Srpskog hemijskog društva. Diplomirala je 08.10.2004. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Odsek za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju prosečnom ocenom u toku studija 9,25 i ocenom na diplomskom radu 10 (deset).

Po završetku osnovnih studija, 2004. godine je upisala doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, odsek Biotehnologija. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija TMF sa prosečnom ocenom 10 (deset). Pohađala je dve međunarodne letnje škole: „*Advanced Biomedical Technologies for Treatment of Osteochondral Defects*“ 2008. godine i „*Stem Cells and Regenerative Medicine*“, 2009. godine u Piranu, Slovenija, koje su organizovali TMF Univerzitet u Beogradu, Zavod za transfuziju krvi Republike Slovenije, Nacionalni institut za biologiju Republike Slovenije i međunarodno društvo *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society* i položila je završne ispite ovih škola, nivoa predmeta doktorskih studija (4 ESPB). 2011. godine je završila obuku „Priprema projektnih predloga“ organizovane u okviru Projekta za jačanje kapaciteta institucija za prekograničnu saradnju (Cross Border Institution Building–CBIB) i kurs „Akademske istraživačke veštine“ u organizaciji Konsultativnog biroa za međunarodne projekte, Sektora za međunarodnu saradnju i evropske integracije.

Milena Žuža je kao stipendista Ministarstva nauke za doktorske studije bila angažovana na projektu Ministarstva „Dodaci hrani dobijeni biotehnološkim putema“ (bth 1008), a kao istraživač-saradnik na projektima: „Razvoj biotehnoloških postupaka za proizvodnju aditiva i novih formulacija za prehrambenu industriju“ (TR-20064), „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ (III 46010) i „Development of enzyme processes for production of egg white protein hydrolysates“ (Eureka projekat E! 6750-ENZEGG). Od školske 2006/2007. godine, angažovana je na izvođenju vežbi iz predmeta: Industrijski enzimski procesi, Farmaceutska biotehnologija, Enzimsko inženjerstvo i Biotehnološki praktikum.

2. OPIS DISERTACIJE

Struktura i sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Milene Žuže sadrži sledeća poglavlja: Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključna razmatranja, Literatura i Prilog. Na početku disertacije dat je izvod na srpskom i engleskom jeziku.

Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U uvodnom delu je ukazano na značaj primene imobilisane penicilin-acilaze u industrijskoj proizvodnji 6-aminopenicilanske kiseline i polusintetskih β -laktamskih antibiotika. Takođe, dat je osvrt na bolja svojstva polusintetskih u odnosu na prirodne antibiotike, kao i na prednosti enzimskog postupka hidrolize penicilina G u odnosu na konvencionalni hemijski proces. Predstavljena je aktuelnost problematike razvoja efikasnog imobilisanog sistema sa penicilin-acilazom kao i osnovni ciljevi ove doktorske disertacije.

Teorijski deo disertacije sastoji se iz pet poglavlja: Penicilin-acilaze, Stabilizacija penicilin-acilaza, Imobilizacija enzima, Bioreaktori za procese sa imobilisanim biokatalizatorima i Sinteza β -laktamskih antibiotika.

U prvom poglavlju su opisana osnovna svojstva penicilin-acilaza, poreklo i klasifikacija, kao i mehanizam delovanja penicilin-acilaza sa posebnim osvrtom na mehanizam delovanja penicilin-acilaze iz *Escherichia coli* i *Achromobacter* sp. Takođe, prikazane su i teorijske osnove specifičnosti prema supstratu penicilin-acilaza različitog porekla i njihova primena. U ovom delu doktorske disertacije kandidat tretira i pitanje hemijske i enzimske hidrolize prirodnih penicilina, kinetiku enzimske hidrolize, inhibiciju, tipove inhibicije kao i uticaj pH i temperature na aktivnost penicilin-acilaza. Dati su različiti kinetički modeli koji su se koristili u literaturi za opisivanje enzimske hidrolize penicilina G.

U drugom poglavlju kandidat iznosi problematiku vezanu za uticaj različitih faktora na stabilnost penicilin-acilaza jer je mala stabilnost enzima osnovni problem za njenu veću komercijalnu primenu. Date su teorijske osnove i mehanizam termalne dezaktivacije penicilin-acilaze, predstavljeni su reverzibilni i ireverzibilni kinetički modeli za opisivanje termalne dezaktivacije enzima i dat je literaturni pregled različitih postupaka stabilizacija penicilin-acilaza kao što je dodatak različitih aditiva ili njena hemijska modifikacija.

U trećem poglavlju je izložena problematika imobilisanih enzima, opisani su postupci za dobijanje imobilisanih enzima, istaknut je njihov značaj za industrijsku primenu kao i mogućnosti i razlike koje se javljaju pri korišćenju slobodnih i imobilisanih enzima u realnim sistemima. Dat je detaljan pregled različitih metoda i nosača koji su ispitani za imobilizaciju penicilin-acilaza, sa posebnim osvrtom na prednosti i nedostatke nosača i metoda koji su korišćeni u ovom radu. Takođe, opisana je i imobilizacija penicilin-acilaze bez nosača (umreženi enzimski kristali i agregati), kao i korišćenje enzimskih agregata kao katalizatora sinteze polusintetskih antibiotika u mikrovođenim sistemima organskih rastvarača. Prikazane su i tehnike imobilizacije u razvoju: integrisano prečišćavanje i imobilizacija penicilin-acilaze, kovalentno vezivanje penicilin-acilaze za temperaturno osetljive polimere, primena namagnetisanih čestica i katalitički elektro-membranski reaktor.

U četvrtom poglavlju su opisani bioreaktori za procese sa imobilisanim biokatalizatorima i to reaktor sa mešanjem i reaktor sa pakovanim slojem. Da bi sistemi sa imobilisanim biokatalizatorima mogli uspešno da se primenjuju, potrebno je obezbediti adekvatne bioreaktorske sisteme koji će omogućiti pogodne hidrodinamičke uslove i efikasan prenos mase i toplote do i od površine biokatalizatora. Naročito su zahtevni enzimi osetljivi na smicanje kada je potrebno obezbediti dobru zaštitu njihovom imobilizacijom. U ovom poglavlju kandidat iznosi problematiku strujanja i mešanja u reaktoru koji određuju raspodelu supstrata i proizvoda i mogu značajnije da utiču na brzinu reakcije.

U petom poglavlju su date teorijske osnove termodinamički i kinetički kontrolisane sinteze polusintetskih antibiotika i mehanizma enzimske sinteze β -laktamskih antibiotika. Zbog male termalne stabilnosti β -laktamskog prstena, enzimska sinteza se generalno izvodi pod blagim uslovima, kao što su niska temperatura i pH, daleko od optimuma aktivnosti enzima. Stoga je brzina reakcije sinteze veoma mala, kao i prinos i produktivnost. Savremena istraživanja su usmerena na primenu mikrovođenih sistema organskih rastvarača u kojima je aktivnost vode mala, pa samim tim se smanjuje odvijanje povratne reakcije hidrolize antibiotika. Pored toga, za dalji razvoj industrijske proizvodnje ovih antibiotika, koja se zasniva na korišćenju enzima, ukazano je da je neophodno optimizovati procesne parametre i izabrati odgovarajući dizajn bioreaktora.

Eksperimentalni deo se sastoji od dva poglavlja: Materijali i Metode. U prvom poglavlju navedeni su svi materijali korišćeni u ovim istraživanjima. U drugom poglavlju su navedene metode za određivanje sadržaja proteina (metoda po Loriju), određivanje aktivnosti slobodne i

imobilisane penicilin-acilaze kao i metode za praćenje kinetike reakcije sa slobodnim i imobilisanim enzimom i određivanje kinetičkih konstanti. Isto tako date su različite metode za imobilizaciju penicilin-acilaze na komercijalnim polimetakrilatnim *Sepabeads* nosačima, metode za modifikaciju enzima derivatima polisaharida, određivanje sadržaja aktiviranog polisaharida u modifikovanom enzimu, za određivanje koncentracije aktivnog enzima na nosaču titracijom aktivnih položaja. Velika pažnja posvećena je metodama za dobijanje hitozanskih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom, aktivaciju hitozanskih mikročestica, za imobilizaciju enzima na hitozanskim mikročesticama i metodama za određivanje brzine reakcije u reaktoru sa pakovanim slojem. Opisane su i metode za karakterizaciju hitozanskih mikročestica (neaktiviranih, aktiviranih i imobilisanih) korišćenjem skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i Furijeove transformacione infracrvene spektroskopskopije (FTIR). Takođe, u okviru eksperimentalnog dela su prikazane i šeme eksperimentalne aparature za dobijanje hitozanskih mikročestica i bioreaktorskog sistema sa pakovanim slojem bez i sa recirkulacijom tečnosti.

Rezultati i diskusija se sastoje od četiri poglavlja: Karakterizacija slobodne penicilin-acilaze, Imobilizacija penicilin-acilaze na polimetakrilatne *Sepabeads* nosače konvencionalnom metodom, Karakterizacija i imobilizacija penicilin-acilaze modifikovane derivatima polisaharida i Imobilizacija penicilin-acilaze na hitozanske mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom.

U prvom poglavlju je okarakterisana slobodna penicilin-acilaza tj. određena je njena specifična aktivnost, pH i temperaturni profil, termalna stabilnost, kao i početna kinetika reakcije hidrolize prirodnog penicilina G katalizovana ovim enzimom. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeni su inhibitorni uticaji supstrata i proizvoda reakcije, kao i vrsta inhibicije. Karakterizacija enzima je bila neophodna da bi se svojstva slobodnog enzima uporedila sa svojstvima imobilisanih enzima, jer je samo na taj način moguće proceniti efikasnost upotrebljene metode imobilizacije.

U drugom poglavlju je ispitana mogućnost direktne imobilizacije nemodifikovane penicilin-acilaze na tri sintetska nosača na bazi polimetakrilata (*Sepabeads* EC-EP, *Sepabeads* EC-EA i *Sepabeads* EC-HA), koji se međusobno razlikuju po koncentraciji i vrsti funkcionalnih grupa. *Sepabeads* EC-EP sadrži epoksidne funkcionalne grupe (oko $100 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$) i enzim se može direktno vezati za površinu nosača preko svojih amino grupa, bez prethodne aktivacije nosača ili enzima. Pretpostavljen je interesantan dvostepeni mehanizam hemijskog vezivanja enzima na epoksidne nosače koji se sastoji od: 1) brze fizičke adsorpcije enzima na hidrofobnom nosaču i 2) hemijske reakcije između adsorbovanog enzima i epoksidnih grupa nosača. Za ovo je neophodno da se imobilizacija odvija u rastvorima visoke jonske jačine. *Sepabeads* EC-EA i *Sepabeads* EC-HA nosači kao funkcionalnu grupu imaju amino grupu koja je preko dve i šest metilenskih grupa, redom, vezana za polimetakrilatnu osnovu. Da bi se enzim imobilisao na njih, nosači su se prethodno aktivirali glutaraldehidom tako da se na njihovu površinu uvedu karbonilne grupe za koje se mogu hemijski vezati amino grupe enzima pod određenim uslovima. Dobijeni imobilizati su okarakterisani, određena im je optimalna temperatura, pH, termalna stabilnost, kao i maseni prinos imobilizacije i prinos aktivnosti. Rezultati su upoređeni i prodiskutovani. Dobijeni rezultati su ukazali na to da se primenom navedenih postupaka imobilizacije enzima, nosač *Sepabeads* EC-HA pokazao kao najpodesniji za imobilizaciju penicilin-acilaze, zatim *Sepabeads* EC-EP, dok je *Sepabeads* EC-EA nepodesan za imobilizaciju.

U trećem poglavlju je ispitana mogućnost primene novog postupka imobilizacije penicilin-acilaze na *Sepabeads* EC-EA i *Sepabeads* EC-HA, koji se zasniva na prethodnoj modifikaciji enzima polialdehidnim derivatima skroba ili alginata i hemijskom vezivanju tako modifikovane penicilin-acilaze na nosače. Ovim se omogućava vezivanje enzima na nosač preko ugljeno-

hidratnog dela, koji je prethodno modifikacijom uveden u molekul, što potencijalno može da doprinese povećanju aktivnosti i stabilnosti imobilisanog enzima jer je poznato da su prirodni glikoproteini stabilniji od protein-enzima. Utvrđeni su optimalni uslovi za kovalentnu imobilizaciju modifikovane penicilin-acilaze i imobilisani enzim je okarakterisan u pogledu efekata imobilizacije na termalnu stabilnost, pH i temperaturni profil. Dodatno, imobilisani enzim je po pitanju ovih parametara upoređen kako sa nativnom, tako i sa modifikovanom formom enzima. Utvrđeno je da dobijeni novi glikoenzimi, skrob-penicilin-acilaza i alginat-penicilin-acilaza, sadrže redom 47% i 53% ugljenohidratnog dela pri čemu zadržavaju oko 95% i 93% prvobitne aktivnosti odgovarajuće količine slobodnog enzima. Na osnovu dobijenih vrednosti konstanti brzine dezaktivacije na 50°C može se zaključiti da je hemijska modifikacija derivatom alginata dovela do destabilizacije modifikovane i imobilisane penicilin-acilaze, za razliku od modifikacije derivatom skroba koja je pogodnija jer dovodi do stabilizacije enzima. Ove razlike u ponašanju penicilin-acilaze modifikovane alginatom i skrobom objašnjene su time što je alginat anjonski polisaharid, dok je skrob neutralni. Očigledno da dodatno negativno naelektrisanje u molekulu enzima negativno utiče na ukupnu preraspodelu naelektrisanja u molekulu enzima i njegovu konformaciju, koje su u direktnoj vezi sa katalitičkim svojstvima i stabilnošću enzima. Rezultati imobilizacije modifikovanog enzima ukazuju da nosač *Sepabeads* EC-HA ima veći kapacitet vezivanja za modifikovani enzim od druga dva nosača, tako da se gotovo sva početna količina enzima vezuje za nosač ($90,4 \pm 2,72$ mg/g suvog nosača). Takođe, utvrđeno je da imobilizacija skrob-penicilin-acilaze na *Sepabeads* EC-HA dovodi do termalne stabilizacije enzima na 50°C, i da enzim nakon imobilizacije može skoro u potpunosti da zadrži aktivnost.

U četvrtom poglavlju ispitana je imobilizacija penicilin-acilaze na hitozanskim mikročesticama koje su dobijene primenom tehnike elektrostatičke ekstruzije, koja se zasniva na ekstruziji rastvora hitozana pod uticajem električnog polja, što omogućuje dobijanje uniformnih čestica malih dimenzija i pravilnog sfernog oblika. Za industrijsku primenu interesantni su prirodni polisaharidi zbog niske cene, biorazgradivosti, makroporozne strukture i velikog broja hidroksilnih grupa koje se mogu aktivirati različitim hemijskim agensima. Pored toga hitozan gelira pod blagim uslovima i može se dobiti u različitim oblicima što ga čini izuzetno povoljnim nosačem za imobilizaciju enzima. Iako je elektrostatička ekstruzija našla veliku primenu za dobijanje alginatnih mikročestica, u literaturi nema podataka o primeni ove tehnike za dobijanje hitozanskih čestica kao nosača za imobilizaciju enzima.

Variranjem parametara procesa određeni su optimalni uslovi imobilizacije korišćenjem elektrostatičke ekstruzije, odnosno određen je optimalni napon, prečnik igle, rastojanje između elektroda, koncentracije hitozana i aktivirajućeg agensa. Dobijeni imobilizati su okarakterisani SEM i FTIR analizom kao i sa aspekta količine imobilisanog enzima, koncentracije aktivnih mesta u ukupnoj količini imobilisanog enzima, i određeni su prinosi imobilizacije i aktivnosti. Ista tako, ispitan je uticaj imobilizacije enzima na pH i temperaturni profil, termalnu stabilnost i kinetička svojstva biokatalizatora. U cilju utvrđivanja mehanizma i jačine inhibicije u imobilisanom sistemu, praćena je početna brzina hidrolize penicilina G u zavisnosti od početne koncentracije supstrata u prisustvu jednog od inhibitora (6-aminopenicilanske kiseline ili fenilsirćetne kiseline) i bez prisustva inhibitora. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđen je inhibitorni uticaj supstrata i proizvoda reakcije, kao i vrsta inhibicije. Najzad, radi razmatranja mogućnosti primene imobilisane penicilin-acilaze u realnim sistemima, ispitivana je početna kinetika hidrolize penicilina G u dva reaktorska sistema: protočnom reaktoru sa pakovanim slojem i protočnom reaktoru sa pakovanim slojem sa recirkulacijom reakcione smeše. Određeni su najpogodniji kinetički modeli koji opisuju brzinu reakcije u ovim sistemima, a zatim su na

osnovu dobijenih kinetičkih konstanti upoređene efikasnosti hidrolize. Dobijeni rezultati su ukazali na to da su primenjeni nosač i metoda imobilizacije odgovarajući za imobilizaciju penicilin-acilaze i da podešavanjem vremena zadržavanja u cevnom reaktoru i rezervoaru sa mešanjem u ovom sistemu je moguće postići veće početne brzine hidrolize.

3. OCENA DISERTACIJE

Savremenost, originalnost i značaj

Interes za efikasnom enzimskom sintezom polusintetskih antibiotika koja je zasnovana na principima zaštite energije i životne okoline je u stalnom porastu. U toku prethodne tri decenije objavljen je veliki broj naučnih radova i патената na temu enzimske hidrolize prirodnih penicilina, kao i sinteze ampicilina i drugih polusintetskih antibiotika, od kojih su neki i komercijalizovani u postrojenjima različitih kapaciteta. Međutim, jedan od najaktuelnijih problema u ovoj oblasti, kao i inače u savremenoj biotehnologiji, gde enzimske reakcije čine suštinu tehnološkog procesa, je problem male operativne stabilnosti enzima u industrijskim uslovima. U cilju prevazilaženja ovih problema u ovom radu su izvedena istraživanja u više pravaca radi stabilizacije penicilin-acilaze i to, imobilizacijom na različitim nosačima ili njenom hemijskom modifikacijom, kao i optimizacijom procesnih uslova i konstrukcije bioreaktora.

Imobilizacija enzima na čvrste nosače preko ugljeno-hidratnog dela bez učešća funkcionalnih grupa od esencijalne važnosti za aktivnost enzima pokazala se kao veoma efikasna za poboljšanje aktivnosti i stabilnosti imobilisanih lipaza, invertaza, proteaza i drugih glikozilovanih enzima. Međutim, da bi se ova metoda primenila na penicilin-acilazu koja nije nativno glikozilovana, osnovni princip je da se hemijskom modifikacijom u molekul enzima uvede 2,3- dialdehidni derivat nekog polisaharida koji se, zatim, može vezati kovalentnom vezom za odabrani nosač. U ovoj doktorskoj disertaciji je prvi put primenjena originalna metoda za imobilizaciju penicilin-acilaze na nosače od komercijalnog značaja koja se zasniva na prethodnoj modifikaciji enzima derivatima skroba i alginata i, zatim, hemijskom vezivanju tako modifikovane penicilin-acilaze na nosače koji sadrže amino grupe kao funkcionalne (*Sepabeads* EC-EA, *Sepabeads* EC-HA). Iako su objavljena brojna istraživanja vezana za hemijsku modifikaciju penicilin-acilaze derivatima različitih polisaharida kao što su karboksimetil-celuloza, dekstran, manan, kalijum-pektat, natrijum-alginat i drugim, na osnovu dosadašnjih saznanja detaljna analiza uticaja različitih parametara na imobilizaciju prethodno modifikovane penicilin-acilaze i karakterizacija tako dobijenih biokatalizatora izvedena u ovom radu, nije bila predmet ranijih istraživanja. Veliki procenat zadržane aktivnosti enzima nakon imobilizacije, kao i izuzetno velike količine vezanog enzima, predstavljaju značajan naučni doprinos u pogledu razvoja tehnika imobilizacije i otvara nove mogućnosti primene imobilisanih penicilin-acilaza kao biokatalizatora.

U ovoj disertaciji je, takođe, razvijen originalni postupak imobilizacije penicilin-acilaze na hitozanskim česticama koje su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom. Hitozanske čestice sa imobilisanim enzimom dobijene pod optimalnim uslovima su ispitane u reakciji hidrolize penicilina G u različitim reaktorskim sistemima: šaržnom sistemu i reaktoru sa pakovanim slojem sa i bez recirkulacije. Kinetika ove enzimski katalizovane reakcije je po prvi put detaljno proučena, a ustanovljeni kinetički modeli omogućili su uvide u mehanizme odvijanja procesa i jačinu inhibicije supstratom i proizvodima reakcije u svakom od ispitivanih reaktorskih sistema. Ovi kinetički podaci su od velikog značaja za dalje usavršavanje i optimizaciju procesnih parametara, kao i režima rada reaktora, u cilju smanjenja inhibicije i razvoja efikasnog

imobilisanog sistema za praktičnu primenu u hidrolizi prirodnog penicilina i proizvodnji polusintetskih antibiotika.

Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U doktorskoj disertaciji citirano je 247 literaturnih navoda koji su omogućili da se prikaže stanje u ispitivanoj oblasti, kao i aktuelnost problematike. Savremena istraživanja objavljena u navedenim naučnim radovima su opisana, analizirana i prodiskutovana i izvedeni su zaključci koji su omogućili dobar uvid u do sada postignute rezultate, primene različitih postupaka stabilizacije i imobilizacije penicilin-acilaza, kao i pregled još uvek nerešenih problema u ovoj oblasti. Na osnovu ovog preseka stanja u literaturi izložene su osnovne smernice za istraživanja koja su izvršena u ovoj doktorskoj disertaciji. Iz obrazloženja predložene teme doktorske disertacije i objavljenih radova u prijavi, koju je kandidat podneo, kao i iz popisa literature koja je korišćena u istraživanju, uočava se adekvatno poznavanje predmetne oblasti istraživanja, kao i poznavanje aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu.

Analiza primenjenih naučnih metoda i njihova adekvatnost za sprovedeno istraživanje

Za dobijanje i karakterizaciju imobilisanih enzima korišćene su savremene hemijske i instrumentalne metode. Aktivnost penicilin-acilaze je određivana spektrofotometrijskom metodom na osnovu merenja količine nastalog proizvoda (6-APK) uz korišćenje *p*-dimetilaminobenzaldehida kao bojenog indikatora. Sadržaj proteina je određen standardnom spektrofotometrijskom metodama po Loriju. Svi postupci hemijske modifikacije enzima, kao i imobilizacije enzima, su se izvodili prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature. U slučaju imobilizacije penicilin-acilaze na hitozanske čestice primenjena je tehnika elektrostatičke ekstruzije koja omogućava dobijanje sferičnih čestica malih dimenzija i sa malom raspodelom veličine čestica. Dobijeni imobilisani enzimi su okarakterisani prema standardnim metodama za određivanje termostabilnosti i operativne stabilnosti, pH i temperaturnog profila, dok je obrazovanje hemijskih veza između enzima i nosača utvrđeno FT-IR spektroskopijom. Morfologija liofilizovanih hitozanskih mikročestica je analizirana korišćenjem skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM).

Ocena primenljivosti i verifikacije ostvarenih rezultata

Na osnovu pregleda do sada objavljenih eksperimentalnih podataka i rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije ostvaren je značajan doprinos u poboljšanju stabilnosti penicilin-acilaze i definisani su optimalni procesni parametri i odgovarajući režim rada bioreaktora za odvijanje hidrolize penicilina G u sistemu sa imobilisanim enzimom. Zaključci i rezultati izneti u disertaciji su bitni za dalji razvoj imobilisanih sistema sa penicilin-acilazom iz *Escherichia coli*. Pored već objavljenih radova, iz disertacije može proisteći još nekoliko međunarodnih naučnih radova.

Ocena sposobnosti kandidata za samostalan naučni rad

Kandidat Milena Žuža je diplomirani inženjer tehnologije. Kao saradnik u istraživanju angažovana je na više projekata koje finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije, kao i na jednom međunarodnom, Eureka projektu. Tokom izrade doktorske disertacije ispoljila je izuzetnu stručnost u pripremi i realizaciji eksperimenta i korišćenju različitih tehnika i metoda, a pri ispitivanju i analizi rezultata je pokazala samostalnost, sistematičnost i kreativnost. Na osnovu dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete koji su neophodni za samostalni naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Doprinos rezultata ove teze može se posmatrati sa sledećih stanovišta:

- u ovom radu ispitan je originalan postupak imobilizacije penicilin-acilaze na komercijalnim *Sepabeads* nosačima koji se zasniva na njenoj prethodnoj hemijskoj modifikaciji derivatima alginata ili skroba i vezivanju ovako modifikovanog enzima preko uvedene ugljenohidratne frakcije za nosače. Odlični rezultati koji su dobijeni, odnosno veliki procenat zadržane aktivnosti enzima modifikovanog derivatom skroba na *Sepabeads* EC-HA nosač nakon imobilizacije, kao i izuzetno velike količine vezanog enzima, predstavljaju značajan naučni doprinos u pogledu razvoja tehnika imobilizacije i otvaraju nove mogućnosti primene imobilisanih penicilin-acilaza kao biokatalizatora;
- takođe, po prvi put je izvršena i optimizovana imobilizacija penicilin-acilaze na hitozanskim mikročesticama koje su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom. Imobilisani enzim na novim hitozanskim mikročesticama zadržava 70-98% aktivnosti u odnosu na nativan enzim u zavisnosti od količine vezanog enzima, što je više od aktivnosti komercijalne penicilin-acilaze imobilisane na hitozan/želatin česticama.
- rezultati ove teze takođe imaju i značajan fundamentalni doprinos razumevanju mehanizama i kinetike hidrolize penicilina G u različitim sistemima sa imobilisanom penicilin-acilazom, naročito definisanjem vrsta i efekata inhibicije. Pokazano je da mehanizam i jačina inhibicije zavise ne samo od svojstava enzima i inhibitora, nego da značajnu ulogu, u tom smislu, imaju svojstva nosača ali i konfiguracija i režim rada reaktora.
- ostvareni rezultati upućuju i na praktičnu mogućnost korišćenja imobilisane penicilin-acilaze iz *E. Coli* na hitozanskim česticama u procesu enzimske hidrolize penicilina G za dobijanje 6-aminopenicilanske kiseline. Izabrano je odgovarajuće reaktorsko rešenje za izvođenje reakcije sa imobilisanim enzimom i razvijen je teorijski kinetički model na osnovu koga se može predvideti ponašanje imobilisanog sistema u dužem vremenskom periodu.

Kritička analiza rezultata istraživanja

Definisanjem ciljeva istraživanja utvrđena je metodologija istraživanja primenjena tokom izrade doktorske disertacije. Uvidom u dostupnu literaturu iz ove oblasti istraživanja koja razmatra imobilizaciju i hemijsku modifikaciju penicilin-acilaze i bioreaktore za procese sa imobilisanim biokatalizatorima, kao i razmatranjem rezultata istraživanja dobijenih primenom odabrane metodologije u okviru ove disertacije, može se primetiti da se dobijeni rezultati nadovezuju ali i značajno dopunjuju postojeće rezultate. Na taj način, ova doktorska disertacija predstavlja važan korak ka praktičnoj primeni imobilisane penicilin acilaze ali i otvara nove mogućnosti za dalja istraživanja novih nosača, kao i postupaka imobilizacije ovog ali i drugih enzima.

Očekivana primena rezultata u praksi

Iako su potencijalne mogućnosti primene imobilisanih penicilin-acilaza u proizvodnji polusintetskih antibiotika velike, o primerima nekih masovnih komercijalnih proizvodnji polusintetskih antibiotika primenom ovih biokatalizatora u potpuno kontrolisanim uslovima danas se još uvek ne može govoriti. Takvih industrijskih primera ima jako malo, a i oni postojeći se značajno razlikuju po načinu imobilizacije enzima i tehnološkim rešenjima procesa. U Srbiji do sada nisu realizovani ni eksperimentalni sistemi na nivou pilot postrojenja i generalno kod nas u pogledu enzimskih procesa nema dovoljno iskustava, pa je preciznija analiza opravdanosti realizacije proizvodnje 6-aminopenicilanske kiseline i polusintetskih antibiotika u imobilisanom sistemu na industrijskom nivou zaista teško izvodljivo. Međutim, u svetu postoje iskustva u komercijalnoj proizvodnji polusintetskih antibiotika sa imobilisanim penicilin-acilazama koja ukazuju na pogodnosti njihovog uvođenja za proizvodnju različitih farmaceutika jer ispunjavaju

zahtevane standarde u pogledu kvaliteta dobijenih proizvoda kao i zahteve u oblasti zaštite životne sredine. Jedinstvene osobine komercijalnih imobilisanih penicilin-acilaza koje se proizvode od strane velikih kompanija, uz ujedno razvijene i odgovarajuće procese hidrolize penicilina, su pod visokim stepenom patentne zaštite od konkurencije. Na osnovu nekih dostupnih podataka u literaturi, može se zaključiti da je u okviru ove teze razvijeno nekoliko imobilisanih sistema sa penicilin-acilazama koji imaju istog reda veličine ili čak veću efikasnost od komercijalnih imobilisanih sistema u pogledu aktivnosti, operativne stabilnosti i prostorno-vremenskog prinosa reaktora. Time ova doktorska teza predstavlja značajan praktičan doprinos ovoj problematici. Takođe, rezultati ove teze doprinose razumevanju mehanizama i kinetike hidrolize penicilina G u različitim sistemima sa imobilisanom penicilin-acilazom, naročito vrstama i efektima inhibicije, kao i izboru konfiguracije i odgovarajućeg režima rada bioreaktora što takođe predstavlja praktičan doprinos daljem razvoju, optimizaciji i kasnijem uvećanju razmera ovih sistema.

Spisak objavljenih radova i saopštenja na konferencijama proizašli iz doktorske disertacije **Radovi u vodećim međunarodnim časopisima (M22)**

1. **Milena G Žuža**, Bojana M Obradović, Zorica D Knežević-Jugović, Hydrolysis of Penicillin G by Penicillin G Acylase Immobilized on Chitosan Microbeads in Different Reactor Systems, *Chemical Engineering & Technology*, 34 (10) 1706-1714, 2011, ISSN: 0930-7516, (IF=1,394).

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

1. **Milena Žuža**, Nenad Milosavić, Zorica Knežević-Jugović, Immobilization of modified Penicillin G acylase on Sepabeads carriers, *Chemical Papers* 63(2), 117-124, 2009, ISSN: 0366-6352, (IF=0,758).

2. **Milena G. Žuža**, Nenad B. Milosavić, Zorica D. Knežević-Jugović, Immobilization of alginate-PAC on Sepabeads EC-HA support, *Hemijska industrija*, 65(4), 431-437, 2011, ISSN: 0367-598X, (IF=0,137).

Rad u časopisu međunarodnog značaja verifikovanog posebnom odlukom (M24)

1. **Milena G. Žuža**, Slavica S. Šiler-Marinković, Zorica D. Knežević, Preparation and characterization of penicillin acylase immobilized on Sepabeads EC-EP carrier, *CI&CEQ*, 13(4), 205-210, 2007, ISSN: 1451-9372.

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51)

1. **Milena G. Žuža**, Slavica S. Šiler-Marinković, Zorica D. Knežević, Immobilization of Penicillin acylase from *Escherichia coli* on commercial sepabeads EC-EP carrier“, *Acta Periodica Technologica* 38, 173-182, 2007, ISSN: 1450-7188.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. **Milena G. Žuža**, Nenad B. Milosavić, Slavica S. Šiler-Marinković, Zorica D. Knežević, Immobilization of modified Penicillin G acylase on Sepabeads carriers, *Proceedings of the 35th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 26-30 May, 2008, Proceedings, p. 227-1-227-11.

3. Zorica Knežević-Jugović, **Milena Žuža**, Enis Džunuzović, Dejan Bezbradica, Katarina Jeremić, Slobodan Jovanović, Covalent immobilization of penicillin acylase from *Escherichia coli* onto macroporous poly(glycidylmethacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate), *Proceedings of the 37th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, J. Markoš, ed., Tatranske Matliare, Slovakia, 24-28 May, 2010, p. 1435-1439.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u celini (M63)

1. **Milena G. Žuža**, Nenad B. Milosavić, Slavica S. Šiler-Marinković, Zorica D. Knežević, Immobilization of starch-Penicillin G acylase neoglycoenzyme on Sepabeads, XLVI Savetovanje Srpskog hemijskog društva, CD sa objavljenim radovima, Beograd, 2008, BT08, 59-62.
2. **Milena Žuža**, Slavica Šiler-Marinković, Zorica Knežević, Immobilization of penicillin acylase from *Escherichia coli* on commercial Sepabeads carrier, VII Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", CD sa objavljenim radovima, Leskovac, 2007, BIH-1/BE-1, 33-42.
4. Zorica Knežević-Jugović, **Milena Žuža**, Enis Džunuzović, Dejan Bezbradica, Katarina Jeremić, Slobodan Jovanović, Covalent coupling methods for immobilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli* onto macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate), Biotehnologija za održivi razvoj, CD sa objavljenim radovima, Beograd, 24-26. novembar 2010, Beograd, p. 33-36.

5. ZAKLJUČAK

Kratak osvrt na disertaciju u celini

Na osnovu svega iznetog, Komisija smatra da doktorska disertacija Milene Žuže, dipl. inž. tehnologije, pod nazivom: „RAZVOJ IMOBILISANIH SISTEMA SA PENICILIN-ACILAZOM IZ *Escherichia coli* ZA DOBIJANJE POLUSINTETSKIH PENICILINA“, predstavlja originalno naučno delo u oblasti Hemija i hemijska tehnologija, uža naučna oblast Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, što je potvrđeno objavljivanjem radova u vodećem međunarodnom časopisu i časopisima međunarodnog značaja, kao i saopštenjima na međunarodnim i nacionalnim konferencijama.

Predlog Komisije Nastavno-naučnom veću

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću TMF da prihvati ovaj Izveštaj i da ga, zajedno sa podnetom disertacijom Milene Žuže, da na uvid javnosti u zakonski predviđenom roku, kao i da, nakon završetka procedure, pozove kandidata na usmenu odbranu disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

U Beogradu, 14.05.2012.

ČLANOVI KOMISIJE

1. Dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor TMF
2. Dr Bojana Obradović, redovni profesor TMF
3. Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor TMF
4. Dr Mirjana Antov, redovni profesor Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu