

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Бранке Лончаревић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.10.2018. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Бранке Лончаревић, мастер биохемичара, истраживача сарадника Института за хемију, технологију и металургију, под називом:

„Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера”

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је, на својој седници одржаној дана 27.12.2018. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (број одлуке: 61206-5722/2-18).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Бранке Лончаревић написана је на 144 стране, А4 формата (фонт 12, проред 1,5) и садржи 44 слике и 17 табела. Подељена је на поглавља: 1. Увод (2 стране), 2. Преглед литературе (53 стране) 3. Материјал и методе (15 страна), 4. Резултати и дискусија (50 страна), 5. Закључак (4 стране), 6. Литература (14 страна). Поред наведеног, дисертација садржи извод на српском и енглеском језику (по једна страна), Садржај (4 стране), Листу скраћеница (4 стране), Захвалницу (1 страна) и Прилоге у којима се налази Биографија кандидата, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

У Уводу је описан предмет истраживања ове докторске дисертације, као и њени циљеви. Кандидаткиња истиче значај и широку примену микробних полисахарида у различитим областима, а посебна пажња је посвећена бактеријском егзополисахариду левану. Такође, описана је актуелност модификације полистирена, природним

полимерима као што је леван. Циљ ове дисертације је био испитивање оптималних услова за достизање максималног приноса екстрацелуларног полисахарида левана бактерије *Bacillus licheniformis* и испитивање утицаја реакционих услова на степен калемљења кополимера левана и полистирена слободнорадикалским механизмом. Након дефинисања циља, кандидаткиња је таксативно навела задатке истраживања, који су детаљно разрађивани у наредним поглављима дисертације.

Преглед литературе обухвата пет целина. У првој целини описани су микробни полисахариди, укључујући њихову физиолошку улогу, биосинтезу, прокариотске и еукариотске продуценте, екстракцију, хемијску анализу и индустријску примену. Друга целина обухвата оптимизацију продукције егзополисахарида, у којој је детаљно објашњен један од најчешћих статистичких приступа експеримената оптимизације под називом метода површине одговора. Употреба поменутог статистичког приступа разматрана је на примерима егзополисахарида декстрана, велан гуме, пулулана и левана. У трећој целини дат је кратак преглед алтернативних извора угљеника за продукцију егзополисахарида са посебним освртом на употребу меласе за добијање левана ферментацијом различитих микроорганизама. У четвртој целини се детаљно разматра биосинтеза, структура, физичко-хемијске особине и микробни произвођачи левана, као и примена овог фруктана у козметичкој и прехранбеној индустрији, медицини, синтези биоматеријала и адхезива. У петој целини су описане стратегије за синтезу калемљених кополимера, преглед модификација полистирена са лигнином, хитином, хитозаном, скробом и декстраном и потенцијал примене калемљених кополимера са полисахаридима.

У оквиру материјала и метода наведен је детаљан опис експерименталних метода и процедура, реагенса и узорака који су коришћени у овој дисертацији. Подаци у вези са микробиолошким методама за синтезу полисахарида, методама за изоловање, пречишћавање и структурну карактеризацију левана, као и методама за синтезу и структурну карактеризацију кополимера левана и полистирена јасно и прегледно су написани.

Поглавље Резултати и дискусија подељено је на пет целина у којима је кандидаткиња детаљно приказала и продискутовала добијене резултате. Прво су приказани резултати испитивања фактора средине који утичу на принос левана бактерије *B. licheniformis* NS032 техником једне променљиве у времену и резултати оптимизације продукције левана методом површине одговора у систему са нижом и вишом концентрацијом сахарозе. У другој целини описани су резултати хемијског састава и претретмана меласе шећерне репе и оптимизације подлоге са меласом за продукцију левана. У оквиру треће целине приказани су резултати испитивања структуре изолованог полисахарида тоталном хидролизом, елементалном органском анализом, инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом (FTIR), нуклеарном магнетном резонантном спектроскопијом (NMR), перјодатном оксидацијом праћеном Смитовом деградацијом и карактеризацијом добијених продуката гасном хроматографијом са масеном спектрометријом (GC-MS) за испитивање типа гликозидне везе, метилационом

анализом комбинованом са GC-MS за одређивање положаја гликозидних веза, односно степена гранања левана, одређивањом молекулске масе полисахарида гел хроматографијом (SEC) и оптичке активности. У четвртој целини анализирани су резултати добијени испитивањем утицаја температуре, атмосфере, реакционог времена, аминоактиватора и редокс система на степен калемљења кополимера левана и полистирена, захваљујући којима је добијен кополимер са максималним процентом калемљења. У петој целини приказани су резултати структурне катактеризације кополимера левана и полистирена FTIR-ом, скенирајућом електронском микроскопијом (SEM-ом), симултаном термогравиметријском/диференцијалнотермичком анализом (TG/DTA-ом), дифракционом анализом X-зрацима (XRD-ом) и ¹³C NMR-ом.

У поглављу Закључак кандидаткиња је на основу детаљно продискутованих резултата, систематски резимирала закључке који су проистекли из ове дисертације.

У делу Литература (146 цитата) обухваћене су публикације релевантне за област истраживања и покривени су сви делови дисертације.

Б. Кратак приказ резултата

Оптимизовањем састава подлоге и услова ферментације добијени су високи приноси левана бактерије *B. licheniformis* NS032, који су имали конкретну примену у синтези калемљеног кополимера са полистиреном. Наведеним приступом добијени су следећи резултати:

- Идентификована је оптимална температура, интензитет аерације, концентрација сахарозе и извор азота за продукцију левана;
- Испитан је утицај међусобних интеракција три променљиве (pH, концентрације сахарозе и амонијум-хлорида) у системима са нижом и вишом концентрацијом сахарозе на продукцију левана и одређена вредност променљивих на којем се достиже оптимум;
- Испитан је утицај међусобних интеракција три променљиве (pH, концентрације сахарозе у меласи и фосфата) на продукцију левана и одређена вредност променљивих на којем се достиже оптимум;
- Редуктивном деградацијом оксидованог полисахарида показано је да су у главном ланцу присутне (2,6)-гликозидне везе;
- Метилационом анализом три узорка полисахарида, добијена ферментацијама у различитим условима, утврђено је да одговарају структури фруктана леванског типа са основним низом сачињеним од фруктофуранозних јединица повезаних (2,6)-гликозидним везама, (2,1)-везаним тачкама гранања и са глукозном хексопиранозном јединицом на нередуционом крају низа;
- FTIR апсорпционе траке и NMR хемијска померања су одговарали подацима који се односе на фруктане леванског типа. Поред метилационе анализе, NMR спектроскопијом је такође потврђена разгранатост молекула;

- Левани произведени на подлогама са укупном концентрацијом сахарозе 200 g/L имају молекулску масу већу од 10^6 , а молекулска маса левана добијеног на подлози са 400 g/L сахарозе је у нижем опсегу (10^5 Da);
- Испитан је утицај температуре, атмосфере, реакционог времена, аминоактиватора и редокс система на реакцију калемљења кополимера левана и полистирена и добијени су оптимални услови за достизање максималног степена калемљења;
- Синтетисани кополимер је структурно окарактерисан помоћу FTIR-а, SEM-а, TG/DTA, XRD-а и ^{13}C NMR-а, што је потврдило формирање кополимера левана и полистирена.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Леван је фруктозни полисахарид кога могу екскретовати различити микроорганизми, а састоји се од β -(2 \rightarrow 6) повезаних β -D-фруктофуранозних јединица са повременим β -(2 \rightarrow 1) гранањима [1]. Због биокомпатабилности, биодеградабилности и обновљивости, у литератури је доступан велики број примера употребе левана у козметици, индустрији хране, биомедицини и нанотехнологији [2], стога је истраживање могућности добијања већих количина, као и нових начина за примену овог полисахарида веома актуелно.

У дисертацији је за оптимизацију продукције левана бактерије *B. licheniformis* NS032 у подлогама са сахарозом и алтернативним и економски приступачнијим супституентом сахарозе, меласом шећерне репе, коришћена метода површине одговора (Response surface methodology, RSM), која комбинује експерименталну стратегију са математичким методама и статистичким закључцима [3]. У литератури се могу пронаћи примери испитивања продукције левана у подлогама са сахарозом, меласом шећерне репе и трске, на различитим бактеријским врстама: *Acetobacter xylinum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lentus*, *Bacillus subtilis*, *Halomonas smyrnensis*, *Microbacterium laevaniformans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia levanicum* и *Zymomonas mobilis*. Приноси левана на различитим подлогама добијени у оквиру ове тезе су међу највишим публикованим у литератури [2].

Претпостављена структура левана бактерије *B. licheniformis* NS032, карактерисана у оквиру ове дисертације, у складу је са литературом у којој је дефинисан леванским тип полисахарида [1]. Степени гранања су такође слични већ публикованим подацима за *B. licheniformis* 8-37-0-1 [4] и *B. subtilis* [5].

Последњих година веома расте интересовање за истраживања модификације синтетичких полимера ради повећања њихове биодеградабилности. Због погодних механичких особина и економичности прераде, полистирен је један од најзаступљенијих материјала у производњи пластике, међутим веома је хемијски инертан [6,7]. До сада је у различитим студијама показана модификација полистирена са различитим полисахаридима, као што су хитозан [8], декстран [9], целулоза [10] и скроб [11]. Према

доступној литератури, до сада није било покушаја да се користи леван у реакцијама калемљења са синтетичким полимерима.

1. Srikanth R., Sundhar Reddy C. H. S. S., Siddartha G., Ramaiah J. M., Uppuluri B. K. *Carbohydr. Polym.* 120 (2015) 102-114.
2. Öner E., Hernandez L., Combie J. *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 827-844.
3. Tanyildizi S. M., Özer D., Elibol M. *Process Biochem.* 40 (2005) 2291-2296.
4. Liu C., Lu J., Lu L., Liu Y., Wang F., Xiao M. *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5528–5533.
5. Benigar E., Dogsa I., Stopar D., Jamnik A., Cigić I. K., Tomšič M. *Langmuir* 30 (2014) 4172–4182.
6. Lambert S., Wagner M. *Chemosphere* 145 (2016) 265–268.
7. Heartwin A., Pushpadass A. H., Weber W. R., Dumais J. J., Hanna, A. M. *Bioresource Technol.* 101 (2010) 7258–7264.
8. Francis R., Baby K. D., Gnanou, Y. *J. Colloid Interf. Sci.* 438 (2015) 110–115.
9. Houga C., Meins L. J.-F., Borsali R., Taton D., Gnanou Y. *Chem. Commun.* (2007) 3063–3065.
10. Espino-Pérez E., Gilbert G. R., Domenek S., Brochier-Salon C. M., Belgacem N. M., Bras, J. *Carbohydr. Polym.* 135 (2016) 256–266.
11. Nikolic V., Velickovic S., Popovic, A. *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 1407–1413.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

1. Радови у часописима међународног значаја:

M21a, Рад у међународном часопису изузетних вредности

1. **B. Kekez**, G. Gojgić-Cvijović, D. Jakovljević, V. Pavlović, V. Beškoski, A. Popović, M. M. Vrvic, V. Nikolić. Synthesis and characterization of a new type of levan-graft-polystyrene copolymer, *Carbohydrate Polymers* (2016) 154: 20-29 (ISSN 0144-8617) (IF₂₀₁₆ = 4.811; Chemistry, Applied 2/72)

M21, Рад у врхунском међународном часопису

1. G.D. Gojgic-Cvijovic, D.M. Jakovljevic, **B.D. Loncarevic**, N.M. Todorovic, M.V. Pergal, J. Ciric, K. Loos, V.P. Beskoski, M.M. Vrvic, Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2019) 121: 142-151 (IF₂₀₁₇; 3.909; Biochemistry & Molecular Biology 79/273)

2. Саопштења са домаћих и међународних скупова

М33, Саопштење са међународног скупа штампано у целини

1. **B. Lončarević**, G. Dj. Gojgić-Cvijović, D. M. Jakovljević, V. P. Beškoski, M. M. Vrvic; Oxidative transformation of levan produced by *Bacillus licheniformis* strain. 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Proceedings Volume II, Belgrade, September 24-28 2018, pp 737-740.
2. **B. Kekez**, G. Gojgić-Cvijović, D. Jakovljević, V. Beškoski, M. M. Vrvic; Structural Characterization of microbial levan by Smith degradation; 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, September 26-30 2016, pp 661-664.
3. **B. Kekez**, G. Dj. Gojgić-Cvijović, D. M. Jakovljević, Lj. S. Živković, V. P. Beškoski, M. M. Vrvic; Synthesis of gold nanoparticles using aldehyde functionalized levan as reducing agent; 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry „Physical Chemistry 2014“, Belgrade, September 22-26 2014, pp. 687-690.

М34, Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. **B. Lončarević**, M. Lješević, G. Gojgić-Cvijović, D. Jakovljević, V. Nikolić, M. M. Vrvic, V. Beškoski; Biodegradability of novel graft copolymer with levan and polystyrene; SETAC Europe 28th Annual Meeting; Rome, Italy, May 13-17, 2018; p. 297-298.
2. **B. Kekez**, M. Ljesevic, G. Gojgic-Cvijovic, D. Jakovljevic, V. Beskoski, M.M. Vrvic; Optimization of levan production by *Bacillus licheniformis* analysed by the response surface method; 6th Congress of European Microbiologists FEMS; Program book, p. FEMS-1074, June 7-11, 2015, Maastricht, The Netherlands.
3. G. Gojgic-Cvijovic, D. Jakovljevic, **B. Kekez**, V. Beskoski, M.M. Vrvic; Levam production by *Bacillus licheniformis* NS032 using sugar beet molasses, 4th International Polysaccharide Conference 2015: „Polysaccharides and polysaccharide-based advanced materials: from science to industry“, Warsaw, Poland 19-22 October 2015, Book of Abstracts, P-71, p. 283.
4. **B. Kekez**, M. Lješević, G. Gojgić-Cvijović, D. Jakovljević, V. Beškoski, M.M. Vrvic, RSM for production of levan by *Bacillus licheniformis* in high sucrose medium; VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld 2015; Barcelona, Spain; 28-30 October 2015, p. 631.
5. **B. Kekez**, A. Djuric, G. Gojgic-Cvijovic, S. Spasic, N. Lugonja, V. Beskoski, D. Jakovljevic, M. Vrvic; Microbial polysaccharides as prebiotics: β -glucan and levan; 5th Congress of Macedonian Microbiologists, Book of Abstracts and Programme, p. 141 (Ohrid, 28-31 May 2014).

М64, Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу

1. **B. Lončarević**, M. Lješević, G. Gojgić-Cvijović, D. Jakovljević, M.M. Vrvic, V.P. Beškoski; Application of microbial levan as a new component for production of graft copolymer with polystyrene. Serbian Biochemical Society Seventh Conference;

- ”Biochemistry of Control in Life and Technology”, Book of abstracts; November 10; Belgrade, Serbia.
2. **Б. Кекез**, В. Николић, Г. Гојгић-Цвијовић, Д. Јаковљевић, В. Бешкоски, М. М. Врвић; Микробни полисахарид леван у реакцији калемљења стирена уз аминоктивацију, XI Конгрес микробиолога Србије, Удружење микробиолога Србије, Микромед 2017, Књига апстраката, стр. 154,155, Београд, 11-13 мај 2017. (ISBN 978-86-914897-4-8).
 3. В. Николић, **Б. Д. Кекез**, Г. Д. Гојгић-Цвијовић, Д. М. Јаковљевић, В. П. Бешкоски, А. Поповић; Синтеза графтованог кополимера употребом микробног левана и полистирена; 53. Саветовање Српског хемијског друштва; Српско хемијско друштво, Програм и кратки изводи радова, Крагујевац, 10. И 11. јун 2016; стр. 87.
 4. **В. Кекез В.**, М. Ljesevic, М. Markovic, Ј. Stefanovic Kojic, G. Gojgic-Cvijovic, D. Jakovljevic, V. Beskoski, М.М. Vrvic; Microbial levan as a potential agent for reducing oxidative stress in *Daphnia magna*; 2nd Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students; Abstract book & Program; February 10-13, 2016; Belgrade, Serbia.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налазе у извештају из програма „iThenticate” којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера”, аутора Бранке Д. Лончаревић, констатујем да утврђено подударане текста износи 5 %. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација **Бранке Лончаревић** у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Б. Закључак

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације под насловом „Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера” закључила да је кандидаткиња Бранка Лончаревић успешно одговорила на постављене задатке везане за испитивање оптималних услова за достизање максималног приноса левана ферментацијом бактерије *Bacillus licheniformis* NS032, одређивање основних структурних карактеристика овог полисахарида и испитивање утицаја

реакционих услова на степен калемљења кополимера левана и полистирена слободнорадикалским механизмом.

Научно-истраживачки рад кандидаткиње је публикован у оквиру два научна рада која су директно проистекла из докторске дисертације: један рад у међународном часопису изузетних вредности (категорија М21а) и један рад у врхунском међународном часопису (категорија М21). Такође, резултати истраживања проистекли из ове дисертације су представљени у виду три саопштења са међународног скупа штампаних у целини (категорија М33), пет саопштења на скупу међународног значаја штампаних у изводу (категорија М34) и четири саопштења на скупу националног значаја штампаних у изводу (категорија М64). Комисија је мишљења да резултати објављени у поднетој докторској дисертацији представљају значајан допринос у области биотехнологије микробних полисахарида и њиховој употреби за добијање кополимера.

На основу свега изложеног, а у складу са Законом о Универзитету и Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да поднету докторску дисертацију Бранке Д. Лончаревић, мастер биохемичара, под насловом „**Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера**” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Комисија:

др Владимир Бешкоски, ванредни професор

Хемијски факултет Универзитета у Београду, ментор

др Александар Поповић, редовни професор

Хемијски факултет Универзитета у Београду

др Гордана Гојгић-Цвијовић, научни саветник

ИХТМ, Универзитет у Београду

др Драгица Јаковљевић, научни саветник
ИХТМ, Универзитет у Београду

др Владимир Николић, научни сарадник
Иновациони центар Хемијског факултета Универзитета у Београду

У Београду,

13.05.2019. године