

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Милице Светозаревић

Одлуком бр. 35/29 од 03.02.2022 године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Милице Светозаревић под насловом

„Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“

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 2015/2016. године кандидат Милица Светозаревић, мастер инж. технологије је уписала докторске студије, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду.

24.12.2020. године на седници Наставно-научног већа донета је одлука бр. 35/385 о именовању Комисије за оцену подобности теме и кандидата Милице Светозаревић, мастер инж. технологије, за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом: „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“.

04.02.2021. године на седници Наставно-научног већа донета је одлука бр. 35/19 о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације Милице Светозаревић, мастер инж. технологије, под називом: „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“, а за менторе ове докторске дисертације именовани су др Душан Мијин, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, и др Наташа Шекуљица, научни сарадник Иновационог центра Технолошко-металуршког факултета.

03.03.2021. године на седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду донета је одлука бр. 61206-972/2-21 о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације Милице Светозаревић, мастер инж. технологије под називом: „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“.

03.02.2022. године на седници Наставно-научног већа Технолошког-металуршког факултета у Београду донета је одлука бр. 35/29, о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске

дисертације Милице Светозаревић, мастер инж. технологије под називом: „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду. Ментори ове докторске дисертације: др Душан Мијин, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, и др Наташа Шекуљица, научни сарадник Иновационог центра Технолошко-металуршког факултета, су на основу објављених публикација и искуства, компетентни за руковођење израде ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Милица (Милан) Светозаревић је рођена 6.10.1990. године у Ђевђелији, Република Северна Македонија. Основну школу и гимназију је завршила у Ђевђелији. Дипломирала је у јулу 2014. године, на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета Св. Кирил и Методиј, у Скопљу, студијски програм Прехрамбена технологија и биотехнологија, са просечном оценом 9,63. Школске 2014/15. године уписала је мастер студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Мастер студије је завршила у септембру 2015. године, одбраном завршног мастер рада на тему „Имобилизација пероксидазе из свежег рена глутаралдехидом у умрежене ензимске агрегате“, са просечном оценом 9,00. Докторске студије је уписала школске 2015/16. године на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Исте школске године је била ангажована као асистент на извођењу вежби на Технолошко-металуршком факултету, Универзитет „Св. Ћирил и Методиј“, Скопље, из предмета Генетски модификовани организми и Генетика индустријских микроорганизама на основним студијама. У фебруару 2017. године запослила се као инжењер технолошког развоја у профитном центру Фармација, „Алкалоид АД“, Скопље, где је радила до новембра 2018. године. У новембру 2018. године Милица Светозаревић је ангажована у Иновационом центру ТМФ-а. У периоду од новембра 2018. године до децембра 2019. године запослена је као истраживач приправник на пројекту „Развој технолошких процеса за третман отпадних вода енергетских постројења применом чистије производње“ (ТР 34009) под руководством професора Мића Јовановића који је финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Од јануара 2019. године до данас ради у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета. Поред тога, учествовала је на пројекту под називом „Одрживи процес бојења заштитне тканине на бази нових боја истакнутих својстава“ (2020-2021). Пројекат је финансиран преко Фонда за иновациону делатност Републике Србије. Звање истраживач приправник је стекла у септембру 2018. године, а истраживач сарадник у јуну 2021. године. Области истраживања Милице Светозаревић су ензимско инжењерство, примена ензима у третману отпадних вода у микрореакторском систему.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација кандидата Милице Светозаревић под називом „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“ је написана на 156 страна (од којих је 144 нумерисано) у оквиру којих се налази 15 поглавља, 69 слика, 5 шема, 9 табела и 238 литературних навода. Докторска дисертација је подељена на Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултате и дискусију, Закључак и Литературу, уз Сажетак на српском и енглеском језику. На крају дисертације дата је Биографија кандидата, као и Изјава о ауторству, Изјава о истоветности 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 разматра се проблем загађења животне средине отпадним водама, при чему је посебан нагласак на отпадним водама текстилне индустрије. Прецизније, у Уводном делу приказани су подаци о обиму потрошње воде у процесима обраде тканине, затим су приказани подаци о количини обојених отпадних вода и штетности истих. Посебно је наведен штетни утицај обојених отпадних вода на животну средину: људе, водени свет и земљиште. С обзиром на обим генерисања отпадних вода и њихов штетни утицај у погледу токсичности, канцерогености и мутагености у Уводном делу је додатно указано на значај решавања овог еколошког проблема.

У **Теоријском делу**, налази се укупно 9 поглавља. У првом поглављу под називом „*Бојење текстила*“ описан је поступак бојења текстила, начин на који се може вршити бојење у зависности од природе влакна, као и механизам везивања боја за тканине. Познавањем процеса бојења тканине могуће је предвидети количине и штетност отпадних вода које заостају након сваког процеса бојења. У другом поглављу под називом „*Процена утицаја отпадних вода на животну средину*“ дата је процена потрошње воде и количина боје која доспева у отпадне воде, токсично дејство отпадних вода уколико се не третира и испушта као таква у околне водотокове и могуће последице по здравље људи и животну средину. Треће поглавље „*Боје*“ садржи дефиниције боја, представљен је кратак историјат, класификација боја са освртом на антрахинонске, које су предмет истраживања ове дисертације, конкретно, Кисело љубичасто 109 (C. I. Acid Violet 109, AV109). У четвртном поглављу „*Технике пречишћавања отпадних вода*“ су наведене технике пречишћавања отпадних вода. Ово поглавље садржи поделу и детаљан приказ техника пречишћавања отпадних вода као што су физичке, хемијске и биолошке. Са тим у вези, детаљно је описана техника пречишћавања отпадних вода методом адсорпције са посебним акцентом на примени активног угља, силика гела и зеолита. Процеси пречишћавања отпадних вода применом коагулације/флокулације, напредних оксидационих процеса, озонизације, електрохемијске технике, ултразвук и др. су објашњене у потпоглављу под називом „*Хемијске методе пречишћавања отпадних вода*“. Поред физичких и хемијских метода, поглавље „*Технике пречишћавања отпадних вода*“ садржи и потпоглавље о биолошким методама пречишћавања отпадних вода где је акценат на примени микроорганизама и ензима са циљем уклањања загађујућих материја из отпадних вода. У петом поглављу „*Пероксидазе*“ дата је дефиниција и приказана је класификација пероксидаза. У овом поглављу пероксидазе су класификоване на основу порекла на: биљне, пероксидазе животињског порекла и пероксидазе пореклом из микроорганизама. Затим, посебна пажња је посвећена пероксидазама које су од значаја за ову докторску дисертацију, биљним

пероксидазама. Описана је њихова физиолошка улога у биљном ткиву као и области примене ових ензима са посебним освртом на области као што су: примена у биосензорима, примена у дијагностици, дрвној и папирној индустрији, примена у синтези органских полимера као и примена у аналитици. На класификацију и примену пероксидаза у оквиру истог поглавља се надовезује и структура пероксидазе из соје. Детаљно је описана примарна, секундарна и терцијарна структура као и каталитички механизам пероксидазе из соје. Пероксидаза из соје је оксидоредукујући ензим који катализује реакције оксидације/редукције различитих ароматичних супстрата у присуству водоник-пероксида, што указује на чињеницу да разградњу антрахинонских боја најбоље описују механизми двосупстратних реакција. Са тим у вези, у оквиру шестог поглавља *„Кинетика ензимских реакција катализованих пероксидазама“* приказана је кинетика ензимских двосупстратних реакција. У овом поглављу је прво извршена класификација двосупстратних реакција на секвенцијалне (насумичне и правилне) и ping-pong реакције. Затим, описан је редослед везивања супстрата и дисоцијације производа у случају секвенцијалног механизма и приказани су математички обрасци који описују наведени модел. Други механизам који описује двосупстратне реакције и који је објашњен и математички описан у овом поглављу је ping-pong механизам. Поред наведених модела, у овом поглављу се разматра и механизам реакције који укључује инхибицију ензима супстратом познат и као инхибиција супстратом у вишку у двосупстратним реакцијама. На темељу механизма двосупстратних реакција, написано је седмо поглавље у којем је обрађен механизам реакција катализованих пероксидазама које припадају класи III, тачније биљним пероксидазама. У осмом поглављу *„Примена микрореакторских система у третману обојених отпадних вода“* уводи се појам континуалних система, тачније, микрореакторски системи. Микрореакторски системи омогућавају потпуну аутоматизацију процеса и њихова примена у третману обојених отпадних вода представља значајан искорак када су технике уклањања синтетичких боја из отпадних вода у питању. Ово поглавље садржи податке који се односе на микрореакторске системе као што су подела, основне карактеристике као и предности и недостаци ових система у односу на шаржне системе. Затим, микрореакторски систем је окарактерисан у погледу Рејнолдсовог броја за ламинарно струјање док је Навије-Стоксова једначина прилагођена условима у микрореакторском систему. Посебно је дефинисано време мешања у микрореактору које узима у обзир пречник микрореактора, коефицијент дифузивности, смицајни напон и Пеклетов број за молекуларну дифузивност у случају ламинарног струјања. Потпоглавље *„Примена микрореактора“* разматра области примене микрореакторских система као што су реакције синтеза органских, биолошких и фармацеутских једињења као и могућности увећања размера процеса.

У деветом поглављу *„Технике имобилизације ензима“* описана је имобилизација ензима: појам имобилизације, предности имобилисаног у односу на слободан ензим, преглед технике имобилизације са акцентом на имобилизацију без носача, која је уједно одабрана техника за имобилизацију пероксидазе у оквиру ове дисертације. Имобилизација ензима је опште прихваћена техника за унапређење својстава одабраног ензима, повећање стабилности ензима и смањење цене коштања процеса који укључује ензимску катализу кроз могућност примене истог ензима више пута у жељеној реакцији. Ово поглавље садржи детаљан приказ техника имобилизације ензима које се заснивају на физичком везивању ензима за одабрани носач, тачније адсорпцији. Затим, приказане су и описане технике обухватања ензима носачем и ковалентне имобилизације ензима. Посебна пажња је посвећена опису технике имобилизације ензима без примене носача, тачније умрежавању ензима. Детаљно је описана техника имобилизације са посебним освртом на избор реагенса за таложење и реагенса за умрежавање.

Експериментални део докторске дисертације је подељен на два потпоглавља, потпоглавље материјали и потпоглавље методе. У потпоглављу материјали таксативно су наведене све хемикалије и реагенси који су били неопходни за реализацију експерименталног плана ове

докторске дисертације. Поред тога, наведени су и уређаји и опрема који су коришћени за извођење експеримената. Након тога, наведене су и детаљно описане све методе. Методе подразумевају детаљан опис поступка издвајања пероксидазе из отпадних материјала, а затим опис методе за одређивање садржаја протеина, модификоване Лоријеве методе и методе за одређивање активности пероксидазе коришћењем стандардног супстрата, пирогалола (1,2,3- трихидроксибензен). Затим, поступно је описана оптимизација процесних параметара за ензимску разградњу боје AV109. Оптимизација процесних параметара обухвата оптимизацију рН, времена контакта, концентрације ензима, концентрације водоник-пероксида, концентрације боје и температуре за сваки ензим посебно, и то за пероксидазу из целог зрна соје, пероксидазу из сојиних љуспица и пероксидазу из кромпирових љуски у шаржном систему. Даље, описан је поступак за испитивање почетне кинетике реакције разградње боје пероксидазом из целог зрна соје, сојиних љуспица и кромпирових љуски. Након оптимизације у шаржном систему следи детаљан опис оптимизације у континуалном систему. Описана је оптимизација процесних параметара: концентрације ензима, концентрације водоник-пероксида, концентрације боје, пречника и дужине микрореактора за пероксидазу из сојиних љуспица и из кромпирових љуски. Затим је описан поступак имобилизације пероксидазе из сојиних љуспица и кромпирових љуски у облику умрежених ензимских агрегата. Техника имобилизације која је испитана је имобилизација у облику умрежених ензимских агрегата, тачније техника имобилизације која не укључује коришћење скупих носача. Поступак је описан у погледу правилног избора таложног реагенса и умрежавања циљаног ензима. Посебан помак у оквиру ове дисертације се односи на коришћење природних полисахарида, у овом случају оксидованог пектина као умрежавајућег реагенса. Са тим у вези, описан је поступак оксидације пектина коришћењем перјодне киселине. Успешности оксидације пектина потврђена је тестом са 2,4-динитрофенилхидразином (DNPH), а структурне промене су потврђене коришћењем инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом. Добијени имобилисани препарат пероксидазе је даље примењен у реакцији биоразградње боје AV 109, што је описано у погледу начина утврђивања рН, концентрације ензима, концентрације водоник-пероксида и концентрације боје, као и испитивања оперативне стабилности имобилизата у шаржном систему. Посебна пажња посвећена је опису поступака имобилизације пероксидазе из сојиних љуспица и кромпирових љуски на зидовима микрореактора. За потврду успешности имобилизације пероксидаза на зидовима микрореактора коришћена је скенирајућа електронска микроскопија (SEM), а метода је посебно описана у одговарајућем потпоглављу. За карактеризацију производа биоразградње, тачније утврђивање деградационих производа коришћене су технике течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом високе резолуције (LC-MS) и гасна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом (GC-MS). Примена обе технике је детаљно објашњена. Метода за утврђивање профила токсичности производа деградације, хемијска потрошња кисеоника (ХПК), је такође описана у експерименталном делу докторске дисертације.

У делу **Резултати и дискусија** приказани су резултати у шест поглавља. У првом поглављу приказани су резултати везани за активност ензима, као и оптимизацију процесних параметара у реакцији разградње боје Кисело љубичасто 109 пероксидазом из целог зрна соје, сојиних љуспица и кромпирових љуски у шаржном систему. Кад је коришћена пероксидаза из целог зрна соје, за време од 30 минута на рН 4, активношћу ензима 0,1 IU, концентрацијом водоник-пероксида 0,1 mM, концентрацијом боје 40 mg/L на температури од 38 °C, постигнута је разградња боје од $81,88 \pm 2,18$ %. Пероксидазом из сојиних љуспица постигнута је разградња $72,78 \pm 3,13$ % за време од 30 минута, на рН 4, активношћу ензима 1 IU, концентрацијом водоник-пероксида 0,01 mM, концентрацијом боје 10 mg/L и на температури од 38 °C. Пероксидазом из кромпирових љуски, за време од 50 минута на рН 4, активношћу ензима 0,6 IU, концентрацијом водоник-пероксида 0,01 mM, концентрацијом боје 40 mg/L на температури од 50 °C, постигнута је разградња од боје $66,12 \pm 2,51$ % .

Након утврђивања оптималне вредности процесних параметара сва три ензима појединачно, приказани су резултати почетне кинетике разградње боје Кисело љубичасто 109 пероксидазом. Кинетички параметри, као што су Михаелис-Ментенова константа (Michaelis-Menten), максимална брзина и константе инхибиције су одређиване моделовањем у MatLab програму. Неретко течни ензимски препарати губе од своје активности па је одређена стабилност пероксидазе из сојиних љуспица и кромпирових љуски током складиштења. Њихова стабилност у синтетичкој отпадној води је такође испитана. У другом поглављу су приказани резултати везани за биоразградњу боје Кисело љубичасто 109 пероксидазом из сојиних љуспица и кромпирових љуски у континуалном систему. Утврђене су оптималне вредности времена задржавања, концентрације ензима, концентрације водоник-пероксида, концентрације боје, пречника и дужине микрореактора за оба ензима посебно. Применом концентрацијских протока: 0,2 IU/mL пероксидазе из сојиних љуспица, 0,2 mM водоник-пероксида, 10 mg/L боје, pH 4, време задржавања 3 минута, пречник микрореактора 0,5 mm и дужина микрореактора 6 m, успешно је разграђено $95,48 \pm 0,41$ % AV109. Помоћу пероксидазе из кромпирових љуски постигнута је биодеградација од $76,95 \pm 1,64$ % у микрореактору, под оптималним условима: pH 4, концентрација пероксидазе 0,8 IU/mL, концентрација водоник-пероксида 1 mM, концентрација боје 150 mg/L, време задржавања 3 минута, пречник микрореактора 0,5 mm и дужина микрореактора 6 m. У трећем поглављу, приказани су резултати везани за имобилизацију ензима. У првој целини овог поглавља дати су резултати имобилизације пероксидазе из сојиних љуспица и кромпирових љуски у облику умрежених ензимских агрегата у шаржном систему. Приказани су резултати оксидације пектина, утицај таложног реагенса на имобилизацију пероксидазе, оптималне вредности концентрације умреживача, као и оптималне вредности pH, концентрације имобилисаног ензима, концентрације водоник-пероксида и концентрације боје у реакцији разградње Кисело љубичасто 109. Међу испитиваним таложним реагенсима: амонијум-сулфат, етанол, 2-пропанол и ацетон, као најпогоднији се показао амонијум-сулфат. Концентрација пектина од 0,5 % је била оптимална за умрежавање пероксидазе из сојиних љуспица. На pH 3, са 0,4 IU имобилизата, 0,2 mM водоник-пероксида и 10 mg/L боје, постигнуто је $85,71 \pm 1,45$ % разградње боје. За умрежавање пероксидазе из кромпирових љуски је било довољно 0,1 % оксидованог пектина. Највећи степен разградње од $82,2 \pm 1,65$ % је постигнут на pH 3, са 0,8 IU имобилизата, 0,4 mM водоник-пероксида и 10 mg/L боје. Оперативна стабилност ензима дискутована је као битан параметар за имобилисани ензим. Након четвртог циклуса задржана активност пероксидазе из сојиних љуспица је износила $31,57 \pm 1,79$ %, док је задржана активност умрежене пероксидазе из кромпирових љуски већ у трећем циклусу износила $19,66 \pm 1,64$ %. Друга целина овог поглавља се односи на имобилизацију ензима у континуалном систему. Приказани су резултати оптималних вредности концентрације ензима и умреживача при имобилизацији пероксидазе из сојиних љуспица и кромпирових љуски. Имобилизација је изведена умрежавањем на зидове микрореактора. Испитана је оперативна стабилност оба имобилизата за разградњу боје Кисело љубичасто 109 у континуалном систему. За имобилизацију пероксидазе из сојиних љуспица у цевном микрореактору коришћена је концентрација пектина од 0,05 %. Оптимална концентрација пероксидазе из сојиних љуспица је 30 IU/mL. Испитивањем оперативне стабилности умрежене пероксидазе из сојиних љуспица у микрореактору, утврђено је да пероксидаза из сојиних љуспица задржала $65,22 \pm 2,03$ % своје активности након 10 циклуса. За имобилизацију пероксидазе из кромпирових љуски на унутрашњим зидовима микрореактора коришћена је концентрација пектина од 0,05%. Концентрација пероксидазе из кромпирових љуски од 2 IU/mL се показала као оптимална. Након 10 циклуса употребе за биоразградњу боје AV109, умрежене пероксидазе из кромпирових љуски у микрореактору, ензим је задржао $35,56 \pm 0,79$ % своје почетне активности. У четвртом поглављу дат је приказ скенирајуће електронске микроскопије имобилисаног ензима на унутрашњој површини зида микрореактора. У петом поглављу приказани су резултати хемијске потрошње кисеоника пре и након ензимског третмана у микрореактору са пероксидазом из сојиних љуспица и

кромпирових љуски. Хемијском потрошњом кисеоника, као параметар који указује на квалитет воде утврђено је смањење вредности потрошње кисеоника од 80,4 % кад је коришћена пероксидаза из кромпирових љуски у континуалном систему, а смеђење од 85,9 % је постигнуто у континуалном систему са пероксидазом из сојиних љуспица. У шестом поглављу приказана је анализа производа разградње испитиване боје помоћу течне хроматографије–масене спектроскопије и гасне хроматографије–масене спектроскопије. Осим приказа експериментално добијених интермедијера, предложен је и механизам разградње боје.

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

Развој индустрије значајно доприноси повећању обима отпада за који је потребно пронаћи одговарајуће решење, где се пре свега мисли на правилно управљање које подразумева заштиту животне средине и човека. Наведени индустријски отпад је до скоро посматран као отпад који нема никакву вредност. Међутим, познавањем и применом биотехнологије могуће је значајно повећати вредност отпаду. Изоловање ензима из отпадног материјала и његова примена у разградњи боје из отпадних вода текстилне индустрије представља одрживи процес, који се уклапа у принципе 4R (Reduce, Reuse, Recycle, Recover). Изолација ензима као сировог екстракта подразумева једноставан поступак који се лако може пренети на индустријски ниво. Овим поступком остварује се уштеда реаганаса и времена у односу на компликоване технике сепарације и пречишћавања ензима. Отпадни материјал као извор ензима смањује трошкове ензимског препарата, а истовремено омогућава употребу отпада. Ензими као биокатализатори, користе се у изузетно малој количини и не загађују додатно отпадну воду, па доприносе чистијој производњи. У оквиру ове докторске дисертације искоришћени су отпадни токови индустрије соје и индустрије прераде кромпира за издвајање ензима са циљем њихове примене у третману отпадних вода. Једноставним поступцима екстракције, сојине љуспице и љуска кромпира су искоришћене за изоловање ензима, пероксидазе која је потом примењена у биоразградњи индустријски значајних боја, антрахинонских боја. Примена поменутих пероксидаза се показала оправданом јер је могуће под благим условима уклонити обојеност у високом проценту из отпадне воде која потиче од синтетичких боја. Оптимизацијом процесних параметара повећава се продуктивност процеса. Кинетички параметри дају увид у афинитет ензима према боји, максималним брзинама реакције, као и информације о потентности могућих инхибитора. Њихово одређивање је од велике важности када се процес преноси на индустријски ниво.

Да би се ензимски процес разградње боје побољшао и унапредио, уводи се континуални систем. На тај начин постиже се побољшана ефикасност као и боље перформансе процеса. Повећани пренос масе и топлоте због бољег мешања, ламинарни проток, већа специфична површина представљају део предности микрореактора. У поређењу са конвенционалним реакторима, реакције у микрореактору поседују већу селективност, мању потрошњу енергије, смањење загађења, као и већу продуктивност. Једна од најзначајнијих предности примене микрореакторског система је могућност преношења процеса на индустријски ниво без претходног тестирања на пилот постројењима, него са једноставним паралелним или серијским везивањем микрореактора.

Имобилизацијом се постиже виšekратна употреба ензима као и њихова стабилизација. Умрежавање ензима, као једноставна техника имобилизације утиче позитивно на стабилност ензима, а са друге стране довољно је блага техника да би ензим задржао велики проценат своје активности. Као најбитнији фактор, цена целокупног процеса се драстично смањује услед могућности за његову употребу више пута. Употреба оксидованог пектина као „зеленог“ умреживача доприноси еколошкој оправданости процеса.

Као потврда савремености и оригиналности, целокупни иновативни поступак за резултат има ефикасан процес разградње боје уз остварење концепта уштеде енергије, заштите животне средине и чистије производње. Резултати ове докторске дисертације пружају и смернице за будућа истраживања у оквиру биотехнолошке области. На основу опсежног прегледа литературе, може се закључити да су истраживања у оквиру ове докторске дисертације у складу са светским и указују на значај и актуелност проучаване проблематике.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У докторској дисертацији је дато 238 литературних навода, од чега је највећи део објављен у последњих 5-10 година у међународним часописима, чиме се потврђује актуелност теме у свету. Научне публикације ранијег датума коришћене су за основна сазнања и испитивања која представљају темељ ове дисертације. Истраживања у наведеним научним радовима су описана, анализирана и дискутована у циљу стицања увида у област ензимске разградње боје. Коришћена литература и наведени објављени радови кандидата указују на изузетно велико 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 у оквиру ове дисертације су поткрепљени одговарајућим експериментима, као и савременим аналитичким инструменталним мерењима према оригиналним или модификованим методама из литературе. Изоловање сировог екстракта ензима из отпадног материјала извршено је екстракцијом водом. Активност пероксидазе је испитана UV-Vis спектроскопијом коришћењем пирогалола као стандардног супстрата. Током оптимизације процесних параметара вршено је праћење промене апсорбанце боје Кисело љубичасто 109 у зависности од рН вредности, концентрације ензима, концентрације водоник-пероксида, концентрације боје и температуре у шаржном систему. Почетна кинетика ензимске реакције је изведена математичким моделовањем применом програма MatLab. Стабилност ензима током складиштења мерена је у временском опсегу од 5 недеља одређивањем степена биоразградње. Ензим је складиштен на температури 4 °С. У континуалном систему, оптималне вредности процесних параметара одређиване су праћењем промене апсорбанце боје Кисело љубичасто 109 у зависности од концентрације ензима, водоник-пероксида, боје, дужине и пречника микрореактора. Оксидација пектина одређена је преко DNPH методе, а структурне промене оксидованог пектина су потврђене FT-IR спектроскопијом. Оперативна стабилност имобилизата је одређена праћењем биоразградње боје у циклусима. Садржај протеина је одређен модификованом Лоријевом методом. Производи деградације су окарактерисани помоћу техника течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом високе резолуције и гасне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом, док је хемијска потрошња кисеоника одређена US EPA дихроматном методом 410.4.

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу спроведених истраживања и добијених резултата у оквиру докторске дисертације може се закључити да је остварен научни допринос у области ензимског инжењерства, који се огледа кроз ефикасан и еколошки процес разградње боје која се користи у текстилној индустрији са могућношћу комерцијалне примене за оксидацију боје у отпадним водама из текстилне индустрије. На основу приказаних резултата утврђено је да сирови екстракт пероксидазе, изоловане из сојиних љуспица или из кромпирових љуски, може успешно бити примењен у разградњи антрахинонске боје Кисело љубичасто 109. Континуална разградња боје пероксидазом у микрореактору чини процес ефикаснијим и доприноси чистијој производњи. Имобилизацијом ензима омогућава се њихова вишекратна употреба и долази до додатног унапређења процеса.

Резултати који су произашли из ове докторске дисертације представљају допринос истраживању и развоју еколошког процеса разградње антрахинонске боје која се користи у текстилној индустрији. Производи разградње боје доприносе бољем разумевању механизма реакције оксидације боје пероксидазом. Почетна кинетика реакције, заједно са изведеним кинетичким константама даје увид у понашање ензима, што је од изузетне важности при преношењу процеса на индустријски ниво. Хемијска потрошња кисеоника указује на квалитет воде и на тај начин потврђује успешност процеса.

Изолација ензима из отпадног материјала доприноси валоризацији тог отпада, а индиректна примена отпада за пречишћавање отпадних вода представља двоструку добит са еколошког и економског аспекта процеса.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

У свом досадашњем истраживачком раду, кандидат Милица Светозаревић показала 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

Научни допринос резултата докторске дисертације огледа се развоју иновативног биотехолошког поступка разградње синтетичких боја коришћењем пероксидаза изолованих из отпадних токова индустрије соје и индустрије прераде кромпира. Појединачни доприноси ове докторске дисертације су:

- Искоришћен је пољопривредни отпадни материјал за изоловање биокатализатора, пероксидазе, за примену у ремедијацији отпадних вода. Разрађен је једноставан поступак екстракције циљаних ензима из отпадног материјала;
- Развијен је еколошки и ефикасан поступак биоразградње синтетичких боја пероксидазом из отпадних токова индустрије соје и индустрије прераде кромпира у шаржном систему, који је утемељен на коришћењу сировог, непречишћеног екстракта ензима, добијеног једноставним поступком екстракције;
- Поступак биоразградње синтетичких боја је у потпуности окарактерисан, у погледу оптималних процесних параметара (рН, трајања реакције, концентрације боје, водоник-пероксида, ензима и температуре) као и у погледу кинетичких законитости (дефинисање

кинетичких константи, Михаелис-Ментенове константе за боју и водоник-пероксид, константе инхибиције за боју и водоник-пероксид, као и максималних брзина реакције) које владају у шаржном систему, што омогућава потпуно разумевање и владање процесом, а што је од значаја за потенцијално увећање размера процеса са индустријског на лабораторијски ниво;

- Направљен је посебан искорак када су поступци биоразградње синтетичких боја у питању, тачније уведен је појам континуалне биоразградње боје у микрореакторским системима. Микрореакторски систем је окарактерисан, утврђен је значај параметара као што су време задржавања, дужина и пречник реактора на процесне параметре разградње синтетичких боја.

- Пероксидаза изолована једноставним поступком екстракције из отпадних токова индустрије соје и индустрије прераде кромпира је успешно имобилисана техником без коришћења носача, умрежавањем где је као умреживач искоришћен природно доступан полисахарид, оксидовани пектин. Поступак имобилизације је детаљно описан како у шаржном тако и у континуалном систему. Пероксидаза добијена у облику умрежених ензимских агрегата је успешно примењена у реакцији биоразградње AV109 боје у шаржном и континуалном систему;

- Посебан допринос ове докторске дисертације је карактеризација раствора након биоразградње, која укључује процену токсичности добијеног раствора и утврђивање производа биоразградње. Течном хроматографијом спрегнутом са масеном спектрометријом високе резолуције и гасном хроматографијом спрегнутом са масеном спектрометријом су утврђени производи биоразградње за које је установљено тестом токсичности – ХПК да су значајно мање штетни у поређењу са полазним обојеним раствором.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Увидом у доступну литературу из области докторске дисертације, као и добијених резултата применом адекватне методологије може се констатовати да приказана истраживања представљају унапређење научних знања. Значајан научни допринос обухвата искоришћење пољопривредног отпада за изоловање ензима, где је први пут изолована пероксидаза из кромпирових љуски и примењена у разградњи боје Кисело љубичасто 109. Искоришћење пољопривредног отпада доприноси одрживости процеса и уклапа се у принципе циркуларне економије. Једноставна изолација ензима у виду сировог екстракта олакшава и скраћује процес. Оптимизацијом процесних параметара одређује се максимална продуктивност и ефикасност процеса. Утврђивање кинетичких параметара омогућава вођење реакције у жељеном смеру и додатно повећава ефикасност процеса. Такође, употреба микрореакторског система за ензимску оксидацију боје доприноси унапређењу самог процеса. Предности микрореакторског система су већа специфична површина, ламинарни проток, бољи пренос масе и топлоте што директно утичу на продуктивности процеса. Унапређења обухватају повећану продуктивност, чистију производњу и аутоматизацију процеса. Идентификовани су производи разградње боје Кисело љубичасто 109 пероксидазом, што доприноси расветљавању ензимског механизма разградње поменуте боје. Имобилизација ензима у облику умрежених ензимских агрегата доприноси економичности процеса. на тај начин, ензим се може лако одвојити од реакционе смеше и користити се више пута. Коришћење пектина, природног полисахарида, као умреживача, унапређује процес са еколошког аспекта. Хемијском потрошњом кисеоника потврђено је да је разградња боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала ефикасна уз смањење токсичности раствора. Овај одрживи и еколошки процес поседује велики потенцијал за пренос на индустријски ниво. Научни допринос докторске дисертације огледа се још и у томе да ова теза пружа могућност за наставак истраживања у области.

4.3. Верификација научних доприноса

Категорија M21:

1. **Svetozarević M.**, Šekuljica N, Knežević-Jugović Z., Mijin D.: Agricultural waste as a source of peroxidase for wastewater treatment: Insight in kinetics and process parameters optimization for anthraquinone dye removal, *Environmental Technology and Innovation*, 21, (2021) 101289, 10.1016/j.eti.2020.101289, (IF₂₀₂₀=5,263, ISSN: 2352-1864).
2. **Svetozarević, M.**, Šekuljica, N., Onjia, A., Barać, N., Mihajlović, M., Knežević-Jugović, Z., & Mijin, D.: Biodegradation of synthetic dyes by free and cross-linked peroxidase in microfluidic reactor. *Environmental Technology & Innovation*, 26 (2022) 102373, 10.1016/j.eti.2022.102373 (IF₂₀₂₁=5,263, ISSN: 2352-1864).

Категорија M23:

1. **Svetozarević M.**, Šekuljica N., Knežević-Jugović Z., Mijin D.: Optimization and kinetic study of anthraquinone dye removal from colored wastewater using soybean seed as a source of peroxidase, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 39 (2020) 197-206, 10.20450/mjcce.2020.2150 (IF₂₀₁₉ =0,829, ISSN: 1857-5552).

Категорија M33:

1. **Svetozarević M.**, Tadić J., Šekuljica N., Dajić A., Mihajlović M., Jovanović M., Mijin D., Ekstrakcija enzima iz biljnog otpadnog materijala: primena u obezbojavanju industrijskih otpadnih voda, 32. Međunarodni kongres o procesnoj industriji - Processing, Beograd, 2019, Zbornik 32. Međunarodni kongres o procesnoj industriji, str. 253-256, ISBN: 978-86-81505-94-6
2. **Svetozarević M.**, Tadić J., Mihajlović M., Dajić A., Jovanović M., *Advantages of Microreactor Technology over Conventional Methods in Enzymatic Wastewater Treatment – Environmental Application of Enzymes*, Environmental impact of illegal construction, poor planning and design IMPEDE 2019, Conference Proceedings, Belgrade 2019, str. 89-97, ISBN: 978-86-901238-0-3.
3. Dajić A., Mihajlović M., **Svetozarević M.**, Tadić J., Jovanović M., *Are the Tube Microreactors Future of Wastewater Treatment?*, Environmental impact of illegal construction, poor planning and design IMPEDE 2019, Conference Proceedings, Belgrade 2019, str. 107-112, ISBN: 978-86-901238-0-3.

Категорија M34:

1. **Svetozarević M.**, Šekuljica N., Dajić A., Mihajlović M., Knežević-Jugović Z., Mijin D., Bridging the gap between sustainability and dye removal processes: dye biodegradation by peroxidase from agroindustrial waste, VII International Congress “Engineering, Environment and Materials in Process Industry“, Jahorina, 17-19 March, 2021, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, Book of Abstracts pp. 187, ISBN: 978-99955-81-38-1.

Категорија M87:

1. Mijin D., **Svetozarević M.**, Šekuljica N., Knežević-Jugović Z., Dajić A., Mihajlović M., Jovanović M., *Novi postupak za biodegradaciju antrahinonskih boja u kontinualnom mikroreaktorskome sistemu peroksidazom izolovanom iz poljoprivrednog otpada*, Patentna prijava P-2020/1145.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега напред изложеног, Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Милице Светозаревић под називом „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“ представља значајан, оригинални научни допринос у области Технолошког инжењерства, што је потврђено, између осталог и објављивањем радова у релевантним часописима међународног значаја, као и презентовањем резултата истраживања на конференцијама.

Комисија предлаже Наставном-научном већу Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом: „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“, кандидата Милице Светозаревић прихвати, изложи на увид јавности и упути на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду, као и да се након завршетка процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

У Београду, 02.03.2022. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

.....
Др Наташа Шекуљица, научни сарадник
Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета

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

.....
Др Зоран Т. Поповски, редовни професор
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“,
Факултет пољопривредних наука и хране

.....
Др Ана Дајић, научни сарадник
Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета