

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Милице Царевић, дипл. инж. технологије.

Одлуком бр. 35/178 од 14.04.2016. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Милице Царевић под насловом

Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама

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

08.12.2014. - Кандидат Милица Царевић, дипл. инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме.

26.02.2015. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, на основу поднетог Реферата Комисије, донета је Одлука о прихватању предлога теме докторске дисертације Милице Царевић, дипл. инж. технологије, под називом „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама“, а за ментора ове докторске дисертације именован је др Дејан Безбрадица, ванредни професор ТМФ-а.

17.03.2015. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Милице Царевић, дипл. инж. технологије, под називом „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама“.

14.04.2016. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је Одлука о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Милице Царевић, дипл. инж. технологије, под називом „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама“.

Кандидат Милица Царевић, дипл. инж. технологије уписала је докторске студије на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију 2009/2010. године. Наставно-научно веће одржано 05.06.2015. године донело је одлуку о продужењу рока за завршетак докторских студија студента Милице Царевић за још два семестра школске 2015/2016. године.

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство (ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија) за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За ментора је изабран др Дејан Безбрадица, ванредни професор ТМФ-а, који је на основу објављених публикација и искуства компетентан да руководи израдом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Милица Царевић је рођена у Горњем Милановцу, где је завршила Основну школу "Момчило Настасијевић" и гимназију "Таковски устанак". Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2005/2006. године. У току студија, четири пута јој је додељена награда „Панта С. Тутунџић“ за постигнут изузетан успех. Примила је и признање Српског хемијског друштва за укупан изузетан успех у току студирања. Дипломирала је на ТМФ-у, на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију 30. 06. 2009. године са оценом 10 на дипломском раду и просечном оценом у току студија 9,43. У периоду од 14. августа до 17. новембра 2009. године похађала је IAESTE праксу на Институту за индустријско млекарство (Санта Фе, Аргентина). По завршетку редовних студија, уписала је докторске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Дејан Безбрадица, ванредни професор).

Од 1.02.2011. године Милица Царевић је као истраживач приправник запослена на пројекту "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонента хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности" ев. бр. ИИИ 46010, који финансира Министарство науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије. У звање истраживач сарадник изабрана је у фебруару 2013. године. У фебруару 2012. године завршила је обуку и положила испит за саветника за хемикалије. Од септембра 2013. године ангажована је у настави на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија на лабораторијским вежбама из предмета Биотехнолошки практикум 1. Коаутор је 13 (тринаест) радова у међународним часописима (осам М21, један М22 и четири М23) и 11 (једанаест) саопштења на домаћим и међународним скуповима (шест М34, четири М63 и један М64).

Положила је све испите предвиђене планом и програм последипломских студија Технолошко-металуршког факултета са просечном оценом 9,91, укључујући и завршни испит. Наставно-научно веће одржано 05.06.2014. године донело је одлуку о давању сагласности за продужење рока за завршетак докторских студија студента Милице Царевић за још два семестра.

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Милице Царевић написана је на 275 страна, са укупно 6 поглавља, 143 слике, 23 табеле и 370 литературних навода. Докторска дисертација састоји се из

следећих поглавља: Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература, уз изводе на српском и енглеском језику.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације дата су основна разматрања значаја микробних β -галактозидаза, са нагласком на β -галактозидазе добијене помоћу бактерија млечне киселине. Посебна пажња посвећена је њиховом доприносу синтези све атрактивнијих функционално активних једињења (галакто-олигосахарида и галактозида физиолошки активних агликона). Описани су физиолошка својства добијених једињења, као и њихова тренутна поља употребе и индустријски потенцијали. На крају поглавља представљени су циљеви рада и план истраживања.

У **Теоријском делу** указано је на широку распрострањеност и разноврсност β -галактозидаза и направљен је детаљан преглед до сада изолованих микробних β -галактозидаза заједно са њиховим најважнијим карактеристикама. Потом, представљене су структуре и механизми деловања најзначајнијих представника β -галактозидаза, а посебно су описани ензими коришћени у току израде дисертације (β -галактозидазе из *Aspergillus oryzae* и *Lactobacillus acidophilus*). На основу доступне научне литературе, детаљно је описан развој ферментационих поступака добијања ензима, као и најчешће примењиваних метода за њихово изоловање и пречишћавање. Представљен је комерцијални значај β -галактозидаза, са посебним освртом на својства и примену за синтезу функционално активних галактозида, од којих су најпознатији галакто-олигосахариди (ГОС). Наведени су најбитнији резултати досадашњих истраживања која су се бавила овом тематиком, описујући различите приступе синтези галакто-олигосахарида и анализирајући утицај кључних реакционих фактора на принос и састав производа. Представљен је актуелни и потенцијални комерцијални значај галакто-олигосахарида за примену у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији заснован на њиховим израженим пребиотским и повољним физичко-хемијским својствима. На самом крају је дат детаљан преглед литературе која описује тренутно стање у области развоја нових имобилисаних β -галактозидаза, као и приказ различитих реакторских конфигурација развијених у циљу побољшања процеса производње ових једињења.

Експериментални део се састоји од два поглавља: Материјали и Методе. У првом поглављу наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, док су у другом поглављу хронолошки наведене методе и услови коришћени у току експерименталног рада, моделовања и обраде резултата. Прво су описани услови и методе одабира најбољег микробног продуцента ензима. Потом, описана је процедура оптимизације ферментационих параметра и састава ферментационог медијума са циљем производње ензима β -галактозидазе у одговарајућем приносу. Имајући у виду интрацелуларну природу ензима, описане су и различите методе коришћене за изоловање и пречишћавање добијеног ензима. Такође, наведене су процедуре коришћене за квантитативно утврђивање ензимске активности, као и садржаја протеина у добијеним ензимским препаратима. Даље су описани поступци карактеризације добијених препарата. Наведени су услови под којима је утврђивана применљивост комерцијалних и произведених ензима у реакцији трансгалактозилације за синтезу галакто-олигосахарида и описане методе раздвајања и квантификовања добијених једињења. Потом су приказане методе примењиване за имобилизацију ензима на различите носаче, као и различите методе модификације ензима и носача. На крају је приказан начин рада у шаржном и семиконтинуалном биореактору са флуидизованим слојем имобилисаног ензима и рецикулацијом супстрата. Представљени су примењени услови рада и конфигурација реакторског система.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду при изради ове дисертације, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са резултатима добијених у радовима из литературе у сличним испитаним системима.

Резултати и дискусија састоје се из шест поглавља: Производња микробних β -галактозидаза, Карактеризација β -галактозидазе из *A. oryzae*, Ензимска синтеза галакто-олигосахарида, Имобилизација β -галактозидаза, Синтеза галакто-олигосахарида у различитим реакторским системима и Синтеза нових биоактивних галактозида коришћењем алтернативних галактозил акцептора.

У **првом поглављу** испитана је могућност производње β -галактозидаза помоћу различитих микробних сојева (бактерија, квасаца, плесни) из колекције култура Катедре за биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко металуршког факултета Универзитета у Београду. Након извршеног одабира најефикаснијег продуцента, извршена је оптимизација састава хранљивих подлога и параметара процеса производње ензима класичном методом варирања једног по једног фактора, као и применом статистичког планирања експеримената у циљу побољшања продукције ензима. Будући да је ензим интрацелуларан, у наставку су примењене различите методе изоловања ензима и упоређене са аспекта приноса активности и специфичне активности ензима. Добијени ензим је затим детаљно окарактерисан (утицај температуре и рН на активност и стабилност, активност у присуству различитих јона, величина молекула и кинетички параметри) како би се утврдили оптимални услови за његову даљу примену. У **другом поглављу** извршена је карактеризација комерцијалног препарата β -галактозидазе из *Aspergillus oryzae*, који је у наредним поглављима коришћен као модел у циљу поређења са продукованим ензимом.

Треће поглавље је обухватило оптимизацију кључних реакционих параметара (температуре, рН, концентрације ензима, дужине трајања реакције и почетне концентрације лактозе) са циљем постизања максималног приноса галакто-олигосахарида. Производи реакције раздвојени су и квантификовани применом течне хроматографије високих перформанси (HPLC), а за потребе карактеризације појединачних изомера у оквиру добијене комплексне смеше производа развијена је и нова брза метода помоћу спектрометрије јонске покретљивости спрегнуте са тандем масеном спектрометријом (IMS-MS/MS).

У **четвртном поглављу** фокус је био на развијању ефикасних и јефтених имобилисаних препарата, који би касније били успешно употребљени у реакцијама трансгалактозилације. Испробано је неколико метода за имобилизацију ензима (комерцијалног и изолованог), при чему је испитан велики број различитих типова носача, модификованих и немодификованих. Имобилисани ензими добијени при оптималним условима имобилизације за сваки појединачни случај су окарактерисани са аспекта своје хидролитичке активности и тестирани у реакцији синтезе галакто-олигосахарида. Одабраним имобилисаним препаратима одређени су температурни и рН оптимум, као и температурна и оперативна стабилност.

Пето поглавље обухвата примену добијених имобилисаних препарата у реакторским системима различитих конфигурација: шаржном и реактору са флуидизованим слојем. Оптимизовани су оперативни услови у биореактору са флуидизованим слојем имобилисаног ензима и утврђене оптималне вредности најзначајнијих реакционих параметара у оба система. Упоредени су приноси производа и оперативна стабилност биокатализатора у оба реакторска система. Такође, под одабраним радним условима испитана је и упоређена хидродинамика оба реакторска система.

У **последњем (шестом) поглављу** испитана је могућност коришћења алтернативних галактозил акцептора у реакцији трансгалактозилације у циљу добијања нових унапређених физиолошки активних једињења. У првом делу испитана је могућност синтезе галактозида салицина, као потенцијално значајног инхибитора галектина, док је у другом делу испитана реакција галактозиловања шећерног алкохола сорбитола са доказаном пребиотском активношћу у циљу добијања разноврсније смеше производа трансгалактозилације. Оптимизација кључних реакционих параметара у оба случаја извршена је коришћењем статистичког планирања експеримената, тј. ротатабилног композиционог експерименталног

плана, што је омогућило сагледавање не само утицаја појединачних фактора, већ и постојећих интеракција испитиваних параметара у посматраном опсегу.

У поглављу **Закључци** јасно и прегледно су изнети закључци изведени на основу резултата представљених у претходним поглављима који су у сагласности са постављеним циљевима рада.

На крају дисертације дат је списак коришћене литературе.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Повећана свест о вишеструким благотворним ефектима функционалне хране, а пре свега пребиотика на људско здравље, узроковала је велики број истраживања у области проналажења нових пребиотских једињења. Под пребиотицима се подразумевају несварљиви састојци хране (најчешће олигосахариди) који омогућавају специфичне промене у саставу и/или активности гастроинтестиналне микробиоте, чиме повољно утичу на свеобухватно здравље човека. Нарочиту пажњу последњих година привлаче пребиотска једињења галакто-олигосахариди, разнородна група несварљивих угљених хидрата најчешће изграђених од једне глукозне и неколико галактозних јединица, који се могу знатно разликовати у степену полимеризације, врстама веза, а сходно томе и особинама. Имају кључну улогу у омогућавању нормалног функционисања људског организма, пре свега у олакшавању варења лактозе, побољшању ресорпције минералних материја, снижавању нивоа холестерола, смањењу ризика од рака дебелог црева, као и у унапређењу имуног система домаћина. Они се могу наћи као природни састојци хуманог млека, у малим количинама има их у меду, воћу и поврћу, али се тренутно добијају ензимском конверзијом лактозе помоћу β -галактозидаза. Иако је традиционално коришћен у реакцијама хидролизе лактозе, прегледом актуелне научне литературе установљено је да се под одређеним реакционим условима (висока концентрација лактозе, висока температура и ниска активност воде) може синтетисати смеша различитих галакто-олигосахарида у скромним приносима. Утицај кључних експерименталних фактора (концентрације и врсте ензима, концентрације воде, температуре, рН вредности и почетне концентрације лактозе) на принос производа и међусобне интеракције ових фактора, међутим, нису детаљно испитани. Већина досадашњих истраживања била је фокусирана на синтезу галакто-олигосахарида помоћу постојећих комерцијалних ензимских препарата, па је од изразитог значаја проналажење нових, специфичних микробних β -галактозидаза које ће показати високу активност, стабилност и омогућити добијање тачно дефинисаних галакто-олигосахарида. За ширу употребу галакто-олигосахарида неопходно је и да се постојећи процеси појефтине применом ефикаснијих метода имобилизације ензима и носача за имобилизацију ензима, па је велики број савремених истраживања усмерен на развој нових имобилисаних β -галактозидаза.

Поред тога, велики научно-истраживачки потенцијал постоји у области синтезе галактозида различитих физиолошки активних агликаона. Иако је недавно потврђено да представљају инхибиторе галектина, чија је пролиферација у корелацији са настанком бројних болести као што су различити тумори, болести срца и хематолошки проблеми, свега неколико публикација са овом тематиком је објављено и углавном се сведе на информацију о могућности синтезе ових производа катализоване ензимима. Стога, остало је неистражено подручје оптимизације реакционих фактора ради повећања приноса физиолошки активних галактозида, нарочито кинетике овог процеса јер су ове реакције углавном кинетички контролисане због истовременог одигравања синтетских реакција и хидролизе производа синтезе.

На основу свега наведеног, у циљу унапређења синтезе галакто-олигосахарида и других физиолошки активних галактозида на почетку рада биће испитана могућност продукције микробних β -галактозидаза жељених особина за примену у реакцијама трансгалактозилације. Биће извршен избор најефикаснијих продуцентата, потом оптимизовани услови гајења (температура, рН, аерација, мешање), као и састав хранљиве подлоге. Такође, у циљу постизања доброг приноса ензима, а по што приступачнијој цени, биће одабране одговарајуће методе изоловања и пречишћавања ензима. Добијени ензим ће затим бити детаљно окарактерисан и упоређен са комерцијално доступним ензимским препаратом са истакнутом трансгалактозилационим потенцијалом. Како су до сада описани углавном шаржни реакторски системи, неопходно је добити имобилисани препарат, супериорних карактеристика, који ће омогућити снижавање укупних процесних трошкова у односу на процесе са комерцијалним ензимима, али и омогућити континуално извођење реакције трансгалактозилације у проточним реакторима. У последњој фази истраживања фокус ће бити на синтези нових функционално активних производа различитих карактеристика и са бројним додатним пољима потенцијалне примене.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитирано је 370 литературних навода који су омогућили да се представи стање у испитиваној научној области, али и да се сагледа актуелност проблематике. Савремена истраживања публикована у реномираним научним часописима су приказана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су дали добар увид у могућност примене β -галактозидаза у различитим реакцијама трансгалактозилације, а првенствено у реакцији синтезе галакто-олигосахарида. Овако направљен преглед и анализа актуелне литературне периодике послужио је као основ за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Преглед литературе која је употребљавана у току истраживања, образложење предложене теме дисертације и објављени радови кандидата наведени у пријави, указују на адекватно познавање области истраживања и актуелног стања истраживања у овој конкретној области.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати приказани у овој докторској дисертацији су доказани применом одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и одбарадом података.

Избор најефикаснијих микробних продуцента ензима, оптимизација параметара производње, као и каснија продукција ензима под оптималним условима извршене су техником субмерзног гајења у модификованим синтетичким (и полу-синтетичким) хранљивим подлогама у термостату са орбиталним мешањем при дефинисаним условима, у циљу добијања ензима у жељеном приносу. Имајући у виду интрацелуларну природу овог ензима за изоловање ензима примењене су различите методе: механичке (ултразвучно разарање, млевање/вортексирање у присуству абразивних средстава, наизменично замрзавање и одмрзавање), хемијске (третирање ћелија детергентима и растварачима) и ензимске (помоћу лизозима из љуске јајета). За анализу добијених ензимских препарата примењене су стандардне спектрофотометријске методе: за одређивање хидролитичке активности праћена је реакција разградње *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (*o*-NPG), а за одређивање концентрације протеина коришћене су методе по Бредфорду (Bradford) и Лорију (Lowry). За пречишћавање узорака коришћене су метода фракционог таложења амонијум-сулфатом, као и хроматографске методе (гел-филтрациона и јоноизмењивачка хроматографија). Након пречишћавања ензим је окарактерисан применом електрофоретских техника.

У току рада у циљу оптимизације најважнијих процесних параметара неколико пута је коришћена метода статистичког планирања експеримената, која се заснива на истовременој промени већег броја параметара, али у складу са претходно одабраним експерименталним планом што омогућује поузданију оптимизацију процесних параметара у ширем интервалу уз значајно смањење броја експеримената. Поред тога, статистички метод омогућује добијање одговарајућих математичких модела на основу којих може да се предвиди понашање система у зависности од процесних параметара и омогући поуздана контрола и регулација процеса. Вишепараметарска анализа добијених резултата извршена је коришћењем статистичког и математичког програмског пакета MATLAB 7.0.

Производи реакције трансгалактозилације галакто-олигосахариди и галактозиди сорбитола раздвојени су и квантификовани течном хроматографијом високих перформанси опремљеном аналитичком колоном за шећере (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺, 300×7,7 mm, 8µm) на 80 °C. Као мобилна фаза коришћена је вода са константним протоком 0,6 ml/min. Детекција производа вршена је помоћу рефрактометријског детектора (RID). Са друге стране, концентрација галактозида салицина биће квантификована применом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC) помоћу аналитичке C18 колоне, а као мобилна фаза биће коришћена смеша метанол/вода. Производ ће у овом случају бити детектован помоћу УВ детектора. У оба случаја доказивање структуре и идентификација добијених производа биће извршене спектрометријом јонске покретљивости (IMS) спрегнутом са масеном спектрометријом.

Имобилизација β-галактозидаза на различите носаче биће извршена применом различитих метода описаних у литератури, као и оригиналне процедуре оптимизоване у оквиру овог експерименталног рада. Најбољи имобилисани препарати биће примењени у различитим реакторским системима (шаржни, реактор са флуидизованим слојем).

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа литертурних података и експерименталних резултата приказаних у оквиру ове дисертације, остварен је значајан допринос примени β-галактозидаза у реакцији трансгалактозилације за добијање пребиотски активних галакто-олигосахарида. До сада, највећа пажња била је поклоњена доступним комерцијалним препаратима β-галактозидаза из плесни и квасаца, међутим, β-галактозидазе пробиотских култура имају склоности ка грађењу специфичних структурних изомера галакто-олигосахарида, са израженим пребиотским потенцијалом. Стога, добијени ензим из *L. acidophilus* може имати изузетан потенцијал у производњи галакто-олигосахарида. Применом детаљне оптимизације најважнијих процесних параметара омогућено је значјно повећање приноса производа. Изведена је кинетичка студија која је резултирала моделима који пружају увид у механизам одигравања реакције катализоване ензимом у различитим реакционим системима. Што је још важније, праћењем кинетике синтезе појединачних изомера примећено је да се може у многоме утицати на састав синтетисаних галакто-олигосахарида. Корак ка повећању економичности процеса начињен је развојем методе имобилизације којом је добијен препарат повећаног афинитета према реакцији трансгалактозилације и применом добијених имобилизата у различитим реакторским конфигурацијама. Развијена је метода добијања нових функционално активних једињења, односно разноврсније смеше производа трансгалактозилације применом алтернативних акцептора (салицина и сорбитола). Примена статистичког планирања експеримената и анализе резултата методом одзивних површина омогућила је сагледавање интерактивних дејстава између кључних параметара процеса и боље разумевање процеса трансгалактозилације.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Милица Царевић је дипломирани инжењер технологије. Током израде докторске дисертације испољила је изузетну стручност у реализацији експеримената и коришћењу различитих техника и метода, а при анализи резултата је показала самосталност, систематичност и креативност. Кандидат има изузетну склоност ка експерименталном раду и инжењерски приступ у развоју и реализацији експерименталних техника. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

- Испитан је велики број микроорганизама (бактерија, квасаца и плесни) из колекције култура Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду у циљу избора најефикаснијег продуцента β -галактозидазе, након чега је за продуцента одабрана пробиотска врста *L. acidophilus*.
- Извршена је оптимизација састава хранљивих подлога и параметара процеса производње ензима у циљу побољшања продукције ензима. Такође, испитано је неколико различитих поступака изоловања ензима, а најефикаснија метода механичког разарања ћелија је оптимизирана са аспекта постизања максималне активности, као и специфичне активности β -галактозидазе. Добијени сирови ензимски препарат се, захваљујући микробном продуценту безбедном по људско здравље, може користити без потребе за приметним методама пречишћавања које додатно поскупљују процес производње ензима.
- Извршена је детаљна карактеризација својстава β -галактозидазе из *L. acidophilus* и овај ензим упоређен је са комерцијалним препаратом β -галактозидазе из *A. oryzae*.
- Оба ензима примењена су у реакцији трансгалактозилације за синтезу галакто-олигосахарида, при чему је реакција оптимизирана са циљем постизања максималног степена хидролизе лактозе и удела галакто-олигосахарида у финалној смеси. Као кључни фактори за постизање максималног приноса реакције идентификовани су концентрација ензима и концентрација лактозе, а пошто су и галакто-олигосахариди супстрати ензима подложни хидролизи, реакција је кинетички контролисана па је оптимизирано и време реакције. Установљено је да оба ензима катализују синтезу три- и тетраолигосахарида, док су пентаолигосахарида присутни само у траговима.
- Применом IMS спрегнуте са масеном спектроскопијом развијена је брза и ефикасна једностепена метода помоћу које је одређена структура добијених галакто-олигосахарида. Установљено је да галакто-олигосахарида добијени у реакцијама катализованим помоћу β -галактозидазе из *A. oryzae* садрже $\beta(1\rightarrow6)$ и $\beta(1\rightarrow3)$ гликозидне везе чији се удео мења у току реакције, што указује и на могућност мењања физиолошке активности добијених производа адекватном контролом кинетике процеса. С друге стране, галакто-олигосахарида добијени помоћу β -галактозидазе из *L. acidophilus* садрже $\beta(1\rightarrow6)$ и новоформиране $\beta(1\rightarrow4)$ везе, чиме је показано да се избором другачијег микробног продуцента ензима не мења само принос галакто-олигосахарида већ и њихова структура, а тиме и физиолошко дејство.

- Иммобилизацијом β -галактозидаза на више носача различитих карактеристика посредством различитих механизма везивања (адсорпцијом или ковалентном иммобилизацијом), показано је да су за примену у катализовању синтезе галакто-олигосахарида најпогоднији носачи са примарним аминок групама на које се ензим адсорбује електростатичким интеракцијама. Најбољи резултати су постигнути са комерцијалним носачем Purolite[®] A109 који има (поли)стирен-дивинилбензенску основу и примарне аминок групе. Значајно унапређење процеса иммобилизације је постигнуто хемијском активацијом карбоксилних група на површини ензима које није довело до губитка ензимске активности, а омогућило је формирање ковалентних веза између носача и ензима и значајно повећање термичке и оперативне стабилности. Установљено је и да иммобилисани ензими показују већи афинитет према реакцији трансгалактозилације јер се, у поређењу са реакцијом са слободним ензимом једнаке хидролитичке активности, добијају виши приноси галакто-олигосахарида.
- Иммобилисани препарати β -галактозидаза поред шаржног, успешно су имплементирани и у биореактору са флуидизованим слојем ензима и рециркулацијом супстрата при чему је показано да је могуће спречити утицај унутрашњег и спољашњег отпора преносу масе на ток реакције и инактивацију ензима услед деловања смицајних напона. Утврђено је да се у биореактору са флуидизованим слојем реакција одиграва подједнаком брзином као у шаржном, али је стабилност ензима повећана па се иммобилисани ензим може користити у већем броју реакционих циклуса.
- Испитана је могућност коришћења алтернативних акцептора галактозил остатака (салицин и сорбитол) у реакцији трансгалактозилације, при чему су добијене нове и разноврсније смеше потенцијалних пребиотика, који ће захваљујући различитој природи конституената имати и додатна физиолошка дејства. Слободне и иммобилисане β -галактозидазе показале су висок афинитет према синтези нових производа, а установљено је да је кључни фактор за постизање високих приноса избор адекватног моларног односа супстрата (лактозе и салицина и сорбитола).

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне научне литературе која описује производњу и примену микробних β -галактозидаза у реакцијама трансгалактозилације у циљу синтезе галакто-олигосахарида и других функционално активних једињења, као и разматрањем резултата проистеклих из истраживања у оквиру ове докторске дисертације може се закључити да добијени ензим у потпуности задовољава неопходне услове за примену у овој области. Примењена иммобилизациона техника и претходна хемијска модификација површине ензима довела је до значајног повећања стабилности иммобилисаног ензима и његовог афинитета према реакцији трансгалактозилације. Додатно унапређење ефикасности процеса постигнуто је применом полуконтинуалног биореактора са флуидизованим слојем иммобилисаног ензима у којем је примењена већа стабилност иммобилисаног ензима и могућност примене у већем броју реакционих циклуса. Одређена је и структура добијених галакто-олигосахарида и установљено је да удео појединих веза зависи од микробног продуцента ензима и фазе реакције, чиме се може и модификовати физиолошка активност финалног производа. Од нарочитог је значаја што су синтетисани и нови галактозиди са потенцијалним физиолошким дејством применом алтернативних галактозил-акцептора (сорбитола и салицина).

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Милица Царевих је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштењима на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су до сада у оквиру четири рада у научним часописима међународног значаја (три M21 и један M23) и два саопштења на међународним и националним скуповима (један M34 и један M64). Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још девет радова у часописима међународног значаја и осам саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

Категорија M21:

1. **Carević, M.**, Bezbradica, D., Banjanac, K., Milivojević, A., Fanuel, M., Rogniaux, H., Ropartz, D., Veličković, D.: Structural elucidation of enzymatically synthesized galacto-oligosaccharides using ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry, -*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01293, 2016 (**IF=2,912**) (ISSN 0021-8561).
2. **Carević, M.**, Ćorović, M., Mihailović, M., Banjanac, K., Milisavljević, A., Veličković, D., Bezbradica, D.: Galacto-oligosaccharide synthesis using chemicaly modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilized onto macroporous amino resin, - *International Dairy Journal*, vol. 54, no. 1, pp. 50-57., 2016 (**IF=2,008**) (ISSN 0958-6946).
3. **Carević, M.**, Veličković, D., Stojanović, M., Milosavić, N., Rogniaux H., Ropartz, D., Bezbradica, D.: Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, -*Process Biochemistry*, vol. 50, no. 5, pp. 782-788, 2015 (**IF=2,524**) (ISSN:1359-5113).

Категорија M23:

4. **Carević, M.**, Vukašinović-Sekulić M., Grbavčić, S., Stojanović, M., Mihailović, M., Dimitrijević, A., Bezbradica, D.: Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria, -*Hemijska Industrija*, vol. 69, no. 3, pp. 305-312, 2015 (**IF=0,562**) (ISSN 2217-7426).

Категорија M34:

5. **Carević, M.**, Stojanović, M., Mihailović, M., Stefanović, A., Grbavčić, S., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D.: The immobilization of β -galactosidase on chemicaly modified immobilization supports, 2nd FCUB Workshop Food Technology and Biotechnology, Beograd, Srbija, 2011., P-26

Категорија M64:

6. **Carević, M.**, Stojanović, M., Jakovetić, S., Mihailović, M., Dimitrijević, A., Trbojević, J., Veličković, D.: Proizvodnja sirovog ćelijskog ekstrakta β -galaktozidaze pomoću bakterija mlečne kiseline, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, Srbija, 2012., pp. 74.

Остали научни радови кандидата:

Категорија M21:

1. Bezbradica, D., Stojanović, M., Veličković, D., Dimitrijević, A., **Carević, M.**, Mihailović, M., Milosavić, N.: Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester, *-Biochemical Engineering Journal*, vol. 71, no.1, pp. 89-96, 2013 (**IF=2,467**) (ISSN 1369-703X).
2. Mihailović, M., Stojanović, M., Banjanac, K., **Carević, M.**, Prlainović, N., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite[®] A109 and its post-immobilization stabilization, *-Process Biochemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 637-646, 2014 (**IF=2,524**) (ISSN:1359-5113).
3. Milisavljević, A., Stojanović, M., **Carević, M.**, Mihailović, M., Veličković, D., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Lipase-Catalyzed Esterification of Phloridzin: Acyl Donor Effect on Enzymatic Affinity and Antioxidant Properties of Esters, *-Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 53, no. 43, pp. 16644–16651, 2014 (**IF=2,587**) (ISSN:0888-5885).
4. Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., Stojanović, M., **Carević, M.**, Marinković, A., Bezbradica, D.: Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase, *-Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 91, no. 2, pp. 439-448, 2016 (**IF=2,349**) (ISSN: 0268-2575)
5. Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., Ćorović, M., **Carević, M.**, Marinković, A., Bezbradica, D.: Epoxy-silanization–tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity, *-Journal of Chemical Technology and Biotechnology* DOI:10.1002/jctb.4595, 2015 (**IF=2,349**) (ISSN:0268-2575)

Kategorija M22:

6. Mihajlovski, K., **Carević, M.**, Dević, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M., Dimitrijević-Branković, S.: Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *-International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 104, no. 1, pp. 426-434, 2015 (**IF=2,131**) (ISSN:0964-8305).

Kategorija M23:

7. Stojanović, M., **Carević, M.**, Mihailović, M., Knežević-Jugović, Z., Petrović, S., Bezbradica, D.: Enzimaska sinteza i primena askorbil-estara masnih kiselina, *-Hemijska Industrija*, vol. 67, no. 2, pp. 239-247, 2013 (**IF=0,562**) (ISSN:2217-7426)
8. Mihajlovski, K., Davidović, S., **Carević, M.**, Radovanović, N., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M., Dimitrijević-Branković, S.: Carboxymethyl cellulase production from a *Paenibacillus* sp., *-Hemijska Industrija*, DOI:10.2298/HEMIND150222038M, 2016 (**IF=0,562**) (ISSN:2217-7426)
9. Stojanović, M., **Carević, M.**, Mihailović, M., Veličković, D., Dimitrijević, A., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Influence of fatty acid on lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl esters and their free radical scavenging capacity, *-Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 62, no. 4, pp. 458-466, 2015 (**IF=1,362**) (ISSN: 1470-8744)

Kategorija M34:

10. Milisavljević, A., Stojanović, M., Dinić, I., **Carević, M.**, Mihailović, M., Milosavić, N., Bezbradica, D.: Lipase-catalyzed synthesis of phloridzin esters, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, F P21.

11. Prlainović, N., Stojanović, M., **Carević, M.**, Mihailović, M., Banjanac, K., Marinković, A., Bezbradica, D.: Two-step modification of silica nanoparticles for covalent lipase immobilization, - *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, BS-NS P001.
12. Mihailović, M., **Carević, M.**, Stojanović, M., Prlainović, N., Banjanac, K., Bezbradica, D.: Chemical modification of Purolite A109 for application in lipase immobilization, - *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, F P34.
13. **Carević, M.**, Vukašinović-Sekulić, M., Stojanović, M., Mihailović, M., Jakovetić, S., Grbavčić, S., Bezbradica, D.: Production and characterization of extracellular α -galactosidase from *Aspergillus oryzae* DSM 1862, - *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, F P14.
14. Jakovetić, S., Luković, N., Grbavčić, S., Jovanović, J., Stefanović, A., **Carević, M.**, Knežević-Jugović, Z.: The kinetic study of oleyl cinnamate synthesis, -*8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 2013, Beograd, Serbia, F P14.

Категорија М63:

15. Stojanović, M., **Carević, M.**, Jakovetić, S., Dimitrijević, A., Trbojević, J., Mihailović, M., Veličković, D.: Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate, - *Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 64-67
16. Jakovetić, S., **Carević, M.**, Grbavčić, S., Stojanović, M., Luković, N., Žuža, M., Mihailović, M.: Esterification of phenolic acids catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*, - *Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 54-57.
17. Mihailović, M., Banjanac, K., Stojanović, M., Prlainović, N., Jakovetić, S., **Carević, M.**: Stabilizacija imobilisane lipaze iz *Candida rugosa* tretmanom imobilizata aminokiselinama, - *Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, Srbija, 2012., pp. 82-85
18. **Carević, M.**, Kasalagidis-Krušić, M., Zrilić, M., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D.: Dobijanje biodegradabilnih polimera iz krompirovog skroba, -*Biotehnologija za održivi razvoj*, Beograd, Srbija, 2010., pp. 81-85.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Милице Царевић, дипл. инж. технологије под називом „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама” сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на међународним и националним конференцијама. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да се докторска дисертација под називом „Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза за примену у трансгалактозилационим реакцијама” кандидата Милице

Царевих прихвати, изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Проф. др Дејан Безбрадица, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

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

.....
Проф. др Маја Вукашиновић-Секулић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Мирјана Антов, редовни професор
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет

.....
Др Душан Величковић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Хемијски факултет