

**UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET
NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**

Predmet: referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Mione Miljković, dipl. biohemičara

Odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, br. 35/92 od 28.05.2020. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Mione G. Miljković pod naslovom „**Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema**”. Posle pregleda dostavljene disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa kandidatom Komisija je sačinila sledeći

REFERAT

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

- Školske 2011/2012. godine Miona Miljković, dipl. biohemičar, upisala je doktorske akademske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.
- 20.04.2017. kandidat Miona Miljković je predložila temu doktorske disertacije pod nazivom: „Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema“, a Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu usvojilo je Komisiju za ocenu naučne zasnovanosti predložene teme.
- 06.07.2017. na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka o prihvatanju Referata Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske disertacije, a za mentora je imenovana dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta.
- 28.8.2017. na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije kandidata Mione Miljković, dipl. biohemičara, pod nazivom „Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema“.
- Na zahtev Mione Miljković, studenta doktorskih studija, a uz saglasnot mentora prof. dr Suzane Dimitrijević-Branković, Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta je na sednici održanoj 20.09.2018. donelo Rešenje br. 20/146-1 o produženju roka za završetak doktorskih studija.
- 28.05.2020. na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je odluka o imenovanju članova Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Mione Miljković, dipl. biohemičara, pod nazivom „Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema“, a za ko-mentora je imenovana dr Vesna Lazić, viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča".

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, za koju je

Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova. Mentor ove doktorske disertacije je dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta koja je na osnovu dosadašnjih objavljenih naučnih radova i iskustva kompetentna da rukovodi izradom ove doktorske disertacije.

1.3. Biografski podaci o kandidatu

Miona G. Miljković je rođena je 21.06.1983. godine u Kruševcu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu "Vuk Karadžić" i gimnaziju „Bosa Cvetić“. Osnovne akademske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2002/03, studijski program Biohemija. Diplomirala je 2009. godine na Katedri za biohemiju, čime je stekla zvanje diplomirani biohemičar. Doktorske akademske studije je upisala školske 2011/2012. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju pod mentorstvom prof. dr Suzane Dimitrijević-Branković. U okviru doktorskih studija položila je sve ispite predviđene studijskim programom, prosečnom ocenom 9,58.

Od 04.01.2012. godine zaposlena je na Tehnološko – metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, angažovanjem na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije“ (evidencioni broj projekta TR 31035) kojim rukovodi prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković. U zvanje istraživač-pripravnik izabrana je 08.03.2012. godine. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 07.05.2015. godine, a reizabrana 31. maja 2018. godine.

Pored nacionalnog projekta, Miona Miljković učestvuje u realizaciji projekta bilateralne saradnje Srbije i Slovenije (2018-2019) pod nazivom „Ispitivanje kontrolisane antimikrobne aktivnosti nanoceluloze inkorporirane nanočesticama srebra“ (rukovodilac dr Jovan Nedeljković). Takođe, učesnik je COST akcije AMiCI (Anti-Microbial Coating Innovations to prevent infectious disease, CA15114) u okviru koje je do sada bila polaznik na jednoj radionici (The AMiCI WG1-WG4 workshop “AntiMicrobial Coatings Applied in Healthcare Settings – Implications for Cleaning Procedures”, Ljubljana, 20-21. mart 2018.) i jednoj obuci (Training School on “Antimicrobial Coatings”, Amsterdam, 8-12 april 2019.).

Autor ili koautor je jednog rada u tematskom zborniku međunarodnog značaja, 3 rada objavljenih u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), 4 rada objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 3 rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), 2 rada u časopisima međunarodnog značaja (M23), 1 rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja, 5 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini (M33), 8 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34), jednog saopštenja sa nacionalnog skupa štampanog u celini (M63), jednog saopštenja sa nacionalnog skupa štampanog u izvodu (M64) i jednog tehničkog rešenja (M82).

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Mione Miljković pod nazivom „Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema“ napisana je na 91 numerisanih strana i uključuje 38 slika, 8 tabela i 243 literaturnih navoda. Disertacija sadrži sledeća poglavlja: *Uvod, Pregled literature, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura*. Na početku disertacije dat je

Rezime na srpskom i engleskom jeziku. Na kraju disertacije data je biografija kandidata, kao i potpisane izjave: o autorstvu, o istovetnosti elektronske i štampane verzije doktorske disertacije i o korišćenju. Po svojoj formi i sadržaju, podneti rad zadovoljava sve standarde za doktorsku disertaciju.

2.2. Kratak prikaz pojedinih poglavlja

U Uvodu disertacije ukazano je na potrebu proizvodnje enzima dekstransaharaze na komercijalnom i otpadnom supstratu kao i primena tehnika imobilizacije enzima. Istaknut je značaj bakterija mlečne kiseline (BMK) i enzima dekstransaharaze, kao producenata glukana, sa posebnim osvrtom na dekstran i glukoligosaharide (GLOS) i oblasti u kojima se oni primenjuju. Naveden je plan istraživanja i osnovni ciljevi doktorske disertacije.

Pregled literature je podeljen na tri tematske celine. U prvom delu detaljno su opisani enzimi glukansaharaze koje sintetišu bakterije mlečne kiseline. Prikazane su reakcije koje katalizuju ovi enzimi i objašnjen mehanizam biosinteze glukana i oligosaharida. Takođe opisano je kako faktori sredine kao što su: temperatura, pH i aeracija kao i sastav podloge utiču na proizvodnju dekstransaharaze. Dat je pregled i kratak opis metoda koji se koriste za prečišćavanje ovih enzima. U posebnom potpoglavlju dat je osvrt na ugljenhidrate koji su proizvod katalitičke aktivnosti dekstransaharaze, dekstran i GLOS kao i na polje njihove primene. Druga tematska celina posvećena je proizvodnji enzima na otpadnom supstratu, tačnije na nus proizvodima agro-industrije. Poseban osvrt je dat na aktuelnost primene agro-industrijskih sporednih proizvoda, kao supstrata ili kao nosača za imobilizaciju ćelija, za proizvodnju različitih biotehnoških proizvoda. U tom smislu izvršen je detaljan pregled naučnih radova koji se odnose na upotrebu različitih otpadnih supstrata za imobilizaciju ćelija BMK. Najveći akcenat je stavljen na među- i nus proizvode prerade šećerne repe, melasu i izluženi repin rezanac. U poslednjem poglavlju teorijskog dela ukazano je na značaj imobilizacije enzima, detaljno su analizirane metode imobilizacije enzima koje su do sada korišćene za imobilizaciju dekstransaharaze. U posebnom potpoglavlju rezimirane su prednosti i mane uporebe nanočestica kao nosača za imobilizaciju enzima.

U poglavlju Ciljevi rada data su četiri osnovna cilja postavljena u izradi doktorske disertacije.

U poglavlju Materijali i metode navedeni su materijali i oprema korišćeni u toku izrade ove disertacije, a zatim su navedene metode korišćene u toku eksperimentalnog rada i obrade rezultata. Prvo su opisane metode za dobijanje enzima iz fermentacione podloge na komercijalnom supstratu i među- i nus proizvodima agro-industrije. Opisani su postupci kvalitativnog određivanja dekstransaharazne aktivnosti slobodnog enzima, koncentracije proteina i količine ugljenihhidrata. Dat je kratak opis metode skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) kojom je utvrđeno da je došlo do imobilizacije BMK na izluženi repin rezanac. Dalje je navedena metoda za prečišćavanje dekstransaharaze i metode pomoću kojih je izvršena karakterizacija enzima. U okviru imobilizacije prvo su opisani uslovi i metode modifikacije nanočestica TiO_2 u cilju dobijanja adekvatnih funkcionalnih grupa, kao i procedura za kvantifikaciju uvedenih epoksi grupa na površini nanočestica. Zatim su opisane procedure korišćene za imobilizaciju dekstransaharaze, kako na nemođifikovane tako i na modifikovane nanočestice TiO_2 , kao i unutar agar-agar matriksa. Za definisanje hemijskih veza kod modifikovanih nanočestica TiO_2 , korišćeni su (DFT) proračuni sa periodičnim uslovima vezivanja (PBC). Dat je i opis procedura korišćenih za kvantitativnu analizu enzimske aktivnosti, kao i koncentracije proteina u dobijenim imobilisanim enzimskim preparatima. Na kraju, opisana

je i metoda razdvajanja i kvantifikovanja proizvoda reakcije katalizovane dekstransaharazom imobilisanom u agarne filmove primenom tačne hromatografije visokih performansi sa refraktometrijskim detektorom i kolonom za razdvajanje šećera.

Poglavlje Rezultati i diskusija obuhvata prikaz rezultata dobijenih u eksperimentalnom delu u ovoj disertaciji, njihovu analizu i diskusiju koja uključuje poređenje sa literaturnim podacima i podeljeno je u tri potpoglavlja. Na samom početku prikazani su rezultati proizvodnje dekstransaharaze, iz novoizolovanog soja *Lc. mesenteroides* T3, u tečnim podlogama submerznim postupkom gajenja. Varirani su faktori sredine (temperatura i aeracija) kao i sastav podloge, pre svega koncentracija saharoze i koncentracija i kombinacija različitih izvora azota, i na taj način dobijeni su optimalni uslovi za maksimalnu sintezu enzima. Zatim su prikazani rezultati izolacije i prečišćavanje dobijene dekstransaharaze kao i određivanja njene molekulske mase. U nastavku je izvršena i prikazana karakterizacija delimično prečišćenog enzima u smislu određivanja temperaturnog i pH optimum i stabilnosti, kao i ponašanja enzima u prisustvu različitih jona metala. Na kraju ove celine su prikazani rezultati karakterizacije strukture dekstrana sintetisanog pomoću dekstransaharaze izolovane iz soja T3.

U drugom potpoglavlju prikazani su rezultati optimizacije proizvodnje dekstransaharaze korišćenjem podloge koja se sastojala iz nus proizvoda agro-industrije, tačnije kombinacije melase i izluženih repinih rezanaca. Analizom mikrografija SEM utvrđeno je da je došlo do imobilizacije ćelija soja *Lc. mesenteroides* T3 na i unutar izluženih repinih rezanaca koji su prošli alkalni pretretman. Dobijeni rezultati pokazali su i da se proizvodnja dekstransaharaze, na supstratu kao što je melasa, može poboljšati korišćenjem alkalno tretiranog izluženog repinog rezanca kao nosača za imobilizaciju bakterijskih ćelija.

U poslednjem potpoglavlju, prikazani su rezultati i diskusija vezani za imobilizaciju dekstransaharaze. Prvo je izvršena funkcionalizacija komercijalnih nanočestica TiO_2 (Degussa P25), radi njihove primene za imobilizaciju enzima, sa idejom da se dobiju imobilisani enzimi povećane aktivnosti i stabilnosti. Primenjena su dva sintetska puta. Jedan je podrazumevao hemijsku modifikaciju reakcijom silanizacije, korišćenjem (3-glicidiloksipropil)trimetoksisilan (GOPTMS-a), koji je kao rezultat imao sintezu nosača sa uvedenim terminalnim epoksi grupama na površinu nanočestice TiO_2 ($\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$). Drugi, novi sintetski put za modifikaciju površine TiO_2 sa amino i aldehidnim grupama, razvijen je korišćenjem prednosti stvaranja kompleksa sa prenosom naelektrisanja (CTC) između površine atoma Ti i liganda tipa slicilata (5-aminosalicilna kiselina (5-ASA)), čime su prvo dobijene amino-modifikovane čestice TiO_2 ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$). Ove čestice ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$) su zatim tretirane glutaraldehydom (GA), što je za rezultat dalo nosač ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$) koji na površini poseduje aldehidne grupe koje mogu da formiraju kovalentnu vezu sa molekulom enzima. Zatim su prikazani rezultati imobilizacije dekstransaharaze na nemođifikovane (TiO_2) i modifikovane nanočestice TiO_2 sa amino ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$), aldehidnom ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$) i epoksi ($\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$) funkcionalnom grupom. Najpre je ispitana kinetika imobilizacije i procent imobilisane aktivnosti dekstransaharaze za sva četiri nosača, dok je termička i operativna stabilnost ispitana samo za imobilisane preparate dekstransaharaze za koje se enzim kovalentno vezao $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$ i $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$. Na kraju ovog poglavlja pokazana je mogućnost primene agar-agar matriksa za imobilizaciju dekstransaharaze i proizvodnju GLOS.

U poglavlju Zaključak, sumirani su najznačajniji rezultati i saznanja proistekla iz ove doktorske disertacije.

U poglavlju Literatura navedene su reference citirane u doktorskoj disertaciji.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost, originalnost i značaj

Od otkrića enzima dekstransaharaze, on dobija sve veći značaj zbog toga što su proizvodi katalitičke aktivnosti ovog enzima, dekstran i glukooligosaharidi, našli primenu u različitim granama industrije. Prva upotreba dekstrana odnosila se uglavnom na medicinu, tako je i njegova najpoznatija i najrasprostranjenija primena zamena za krvnu plazmu. Primena u hemijskoj industriji je ništa manje značajna, s obzirom da jedni od najpoznatijih matriksa za hromatografiju (Sephadex-i) predstavljaju umrežene dekstrane. Takođe, interesovanje za oligosaharide generalno, naglo je poraslo širom sveta, od trenutka kada je nekima od njih dodeljen status prebiotika. Oligosaharidi različitog porekla počeli su intenzivno da se upotrebljavaju i kao sastojci hrane i kao farmaceutski suplementi. Sinteza dekstrana se danas, kao i na samom početku, odvija fermentacijom pomoću BMK kao najjeftinijim vidom proizvodnje. Kako postoji niz mana ovog procesa kao što su: mala kontrola nad reakcionim uslovima, potrošnja supstrata (saharaze) na rast bakterije i kontaminacija proizvoda proteinima, kao alternativa za rešavanje ovih problema se prirodno nameće korišćenje enzima, dekstransaharaze. Da bi korišćenje enzima za proizvodnju dekstrana bilo i ekonomski opravdano, pažnja i istraživanja usmerena su ka primeni različitih metoda za imobilizaciju dekstransaharaze. Imobilizacijom bi se omogućila višestruka upotreba enzima a ne bi bilo teško izvoditi ni kontinualni proces čime bi bila omogućena potpuna automatizacija procesa, a samim tim i smanjenje troškova proizvodnje dekstrana. Poslednjih godina kao nosači za imobilizaciju enzima se sve više koriste nanomaterijali. Intenzivna istraživanja na polju nanotehnologije dovela su do razvoja procedura sinteze, koje mogu da obezbede nanomaterijale željenih osobina. Novija istraživanja ukazala su da imobilizacija enzima na nanomaterijale može da poboljša njegovu operativnu, termičku i pH stabilnost u poređenju sa enzimima imobilisanim na konvencionalne nosače pre svega zbog osobina kao što su velika specifična površina po jedinici mase i minimalna difuziona ograničenja.

Zbog svih navedenih razloga predmet ove doktorske disertacije bio da se ispita mogućnost imobilizacije dekstransaharaze iz novoizolovanog soja BMK, *Leuconostoc mesenteroides* T3, na nemodifikovane i modifikovane čestice TiO_2 i unutar agar-agar matriksa. Komercijalne čestice TiO_2 (Degussa P25) modifikovane su u cilju funkcionalizacije površine, kako bi se efikasnije imobilisala dekstransaharaza na nosače i tako dobio imobilisani enzimski sistemi povećane aktivnosti i stabilnosti. U ovoj disertaciji su kao modifikujućim agensima korišćeni orgaosilan (3-glicidiloksi)propil)trimetoksisilan i 5-aminosalicilna kiselina (5-ASA), pa su dobijeni derivati sa terminalnom oksiranskom i amino funkcionalnom grupom na površini nanočestica. Međutim, pošto je jedan od najvažnijih parametara imobilizacije stabilnost imobilisanih enzimskih preparata, a kovalentno imobilisani enzimi u najvećem broju slučajeva pokazuju dodatnu stabilnost u odnosu na enzime vezane adsorpcijom, derivati sa amino grupom koji omogućavaju samo imobilizaciju enzima adsorpcijom, dodatno su aktivirani u reakciji sa glutaraldehidom. Ovo je bio prvi put da se ovako modifikovane nanočestice TiO_2 koriste kao nosači za imobilizaciju dekstransaharaze. Nakon optimizacije imobilizacije enzima na nemodifikovane i modifikovane nanočestice TiO_2 ispitane su operativna (mogućnost ponovne upotrebe imobilisanih preparata u više reakcionih ciklusa) i termička stabilnost kovalentno imobilisane dekstransaharaze, da bi se utvrdilo da li ovakve nanočestice ispunjavaju parametre za potencijalnu primenu u imobilizaciji enzima.

Istovremeno, različite grane industrije generišu velike količine sporednih proizvoda, čije odlaganje postaje sve veći problem. Ovo je posebno problem za zemlje u razvoju jer može da ima negativan uticaj na životnu sredinu. S obzirom na to da "otpadna" sirovina jedne industrije možda može da posluži kao supstrat za drugu granu industrije i na taj način pomogne održivom razvoju, sve češće se javlja ovakav pristup rešavanja ovog problema.

Različiti "otpadni" materijali, uključujući i melasu, korišćeni su kao izvor ugljenika za proizvodnju dekstransaharaze. U ovoj disertaciji kombinacija melase i izluženog repinog rezanaca, nus proizvoda industrije šećera, korišćena je za unapređenje proizvodnje ovog enzima, i predstavljaju jednu od prvih studija o proizvodnji dekstransaharaze na ovakvom supstratu.

Na osnovu opsežnog pregleda literature, može se zaključiti da se istraživanja u okviru ove doktorske disertacije uklapaju u svetske trendove i ukazuju na značaj i aktuelnost proučavane problematike.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U okviru doktorske disertacije citirano je 243 literaturnih navoda koji ukazuju na aktuelnost istraživanja u ispitivanoj oblasti, a većina referenci predstavlja naučne radove objavljene u vrhunskim međunarodnim časopisima u poslednjoj deceniji. Istraživanja prikazana u navedenim referencama su korišćena za planiranje eksperimentalnog rada, analizu i tumačenje rezultata dobijenih tokom izrade doktorske disertacije i izvođenje zaključaka. Takođe, među literaturnim navodima se nalaze relevantni udžbenici i pregledni radovi ranijeg datuma, koji predstavljaju bazična saznanja iz predmetne oblasti i polaznu osnovu za tumačenje eksperimentalnih rezultata.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

Plan istraživanja u okviru doktorske disertacije je ostvaren korišćenjem odgovarajućih eksperimentalnih tehnika i savremenih analitičkih instrumentalnih metoda prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature, kao i adekvatnom analizom i obradom podataka.

Radni mikroorganizam je ispitan sa aspekta unapređenja proizvodnje dekstransaharaze u tečnoj komercijalnoj podlozi i podlozi sa otpadnim sirovinama (melasi i izluženom repinom rezancu). Aktivnost dekstransaharaze je određivana spektrofotometrijskom metodom, preko određivanja sadržaja redukujućih šećera (DNS metoda -3,5-dinitrosalicilna kiselina), korišćenjem saharoze kao supstrata. Optimizacija procesa proizvodnje enzima u oba slučaja ispitana je korišćenjem metode optimizacije u kojoj se tokom vremena varira samo jedan faktor dok se vrednosti ostalih drže konstantnim (one factor at the time approach). Analiza morfologije površine nosača (izluženog repinog rezanca) i nosača sa imobilisanim ćelijama rađena SEM-ijom. Kao metoda prečišćavanja enzima korišćeno je prečišćavanje taloženjem polietilen glikolom. Za kvantitativno određivanje ugljenih-hidrata vezanih za molekul enzima korišćena je standardna spektrofotometrijska metoda sa fenolom i koncentrovanom sumpornom kiselinom. Dobijena dekstransaharaza je detaljno okarakterisana, vršeno je određivanje veličine i detekcija aktivnosti primenom metode GEL-elektroforeze. Glukan dobijen kao proizvod katalitičke aktivnosti dekstransaharaze okarakterisan je kao dekstran primenom FTIR instrumentalne metode.

Koncentracija epoksi grupa, uvedenih prilikom modifikovanja čestica TiO_2 određivana je korišćenjem metode titracije pomoću $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$.

Imobilizacija dekstransaharaze na nemodifikovane i modifikovane čestice TiO_2 kao i unutar agar-agar matriksa izvršena je primenom metoda prethodno opisanih u relevantnim

literaturnim izvorima, kao i primenom originalnih procedura optimizovanih u okviru ovog eksperimentalnog rada. Za određivanje aktivnosti dobijenih imobilisanih enzimskih preparata primenjena je standardna spektrofotometrijska metoda (DNS) kao i za slobodni enzim. Za određivanje koncentracije imobilisanih proteina korišćena je metoda po Loriju (Lowry).

Proizvodi katalitičke aktivnosti dekstransaharaze imobilisane u agar-agar matrikse (GLOS) kvantifikovani su tačnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) opremljenom analitičkom kolonom za šećere (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺, 300 × 7,7 mm, 8μm i Hypersil™ APS-2, 250 mm × 4 mm, 5μm.). Detekcija proizvoda vršena je pomoću refraktometrijskog detektora (RID).

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, može se zaključiti da je ostvaren značajan doprinos u primeni nanočestica TiO₂ i agar-agar matriksa kao nosača za imobilizaciju dekstransaharaze. Ustanovljeno je da hemijskim modifikacijama nanočestica TiO₂ dobijaju nosači za koje se enzima može kovalentno vezati, što je doprinelo povećanju njegove aktivnosti i stabilnosti. U imobilizaciji dekstransaharaze najveća aktivnost postignuta je za nosače TiO₂/5-ASA/GA i TiO₂/GOPTMS koji omogućavaju formiranje kovalentne veze a dobijeni imobilisani sistem TiO₂/5-ASA/GA pokazao je i zavidnu operativnu stabilnost, što je preduslov za korišćenje u industrijskim uslovima. Imobilizacija u agar-agar matrikse pokazala se kao odgovarajuća metoda za imobilizaciju dekstransaharaze za proizvodnju GLOS. Utvrđeno je da odnos akceptora i supstrata diktira dužinu lanaca GLOS, što je od ogromnog značaja prilikom sinteze oligosaharida koji bi potencijalno mogli da se koriste kao prebiotici. U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da se nus proizvodi agro-industrije, melasa i izluženi repin rezanac, mogu koristiti kao podloga za sintezu dekstransaharaze, što ima velikog značaja i sa ekološkog i sa ekonomskog aspekta na proizvodnju ovog enzima. Dobijeni rezultati pokazali su da se proizvodnja dekstransaharaze, na supstratu kao što je melasa, može poboljšati korišćenjem alkalno tretiranog izluženog repinog rezanca kao nosača za imobilizaciju bakterijskih ćelija.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

U svom dosadašnjem istraživačkom radu, kandidat Miona Miljković, dipl. biohemičar, pokazala je samostalnost i stručnost u pretraživanju literature, pripremi i realizaciji eksperimenata, korišćenju različitih tehnika i analizi i obradi rezultata. Na osnovu dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalan naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije imaju višestruko značajan naučni, ali i praktičan doprinos, pri čemu se može izdvojiti sledeće:

- Utvrđeni su optimalni uslovi i sastav podloge za sintezu dekstransaharaze iz novog izolata *Lc. mesenteroides* T3;
- Enzim je izolovan, prečišćen i detaljno okarakterisan za dalju primenu;
- Razvoj optimalnog sastava podloge za proizvodnju dekstransaharaze, koja se zasniva na kombinaciji jeftinih i dostupnih sirovina (nus proizvoda industrije šećerne repe);

- Modifikacijom površine nanočestica TiO_2 epoksi-organosilanom, dobijen je nov nosač nanodimenzija za imobilizaciju dekstransaharaze sa koncentracijom uvedenih epoksi grupa na površini epoksi-modifikovanih nanočestica TiO_2 ($\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$) oko 500 $\mu\text{mol/g}$;
- Razvijen je novi sintetski put za modifikaciju površine TiO_2 sa amino i aldehidnim grupama, korišćenjem prednosti stvaranja kompleksa sa prenosom naelektrisanja (CTC) između površine atoma Ti i liganda tipa salicilata (5-aminosalicilna kiselina (5-ASA)), čime su prvo dobijene amino-modifikovane čestice TiO_2 ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$) kao nosač za imobilizaciju enzima. Ove čestice ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$) su zatim tretirane glutaraldehidom, što je za rezultat dalo nosač ($\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$) koji na površini poseduje aldehidne grupe koje mogu da formiraju kovalentnu vezu sa molekulom enzima;
- Imobilizacijom dekstransaharaze na nemođifikovane i modifikovane nanočestice TiO_2 utvrđeno je da se najefikasnija imobilizacija odigrava formiranjem kovalentne veze između enzima i epoksi, odnosno aldehidnih grupa prisutnih na površini $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ i $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$ nanočestica;
- Optimizovana je formulacija za imobilizaciju enzima unutar agar-agar filmova i ovako imobilisana dekstransaharaza primenjena je za sintezu GLOS. Konstatovano je da ovako imobilisan enzim ima dobru operativnu stabilnost i potencijal za primenu za imobilizaciju i drugih glukansaharaza koje sintetišu oligosaharide sa prebiotskim efektom.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Imajući u vidu da se kod nas i u svetu dekstran još uvek proizvodi šaržno, gajenjem bakterija na hranljivoj podlozi i taloženjem sintetisanog dekstrana nakon završene fermentacije, i uzevši u obzir mane takvog postupka, dolazi se do zaključka da bi se primenom imobilisanih enzimskih preparata dekstransaharaze moglo preći na kontinualni proces, što bi omogućilo i mnogo veću ekonomičnost i rentabilnost samog procesa proizvodnje. Pregeledom dostupne naučne literature koja opisuje imobilizaciju dekstransaharaze na različite nosače, kao i razmatranjem rezultata proisteklih iz istraživanja u okviru ove doktorske disertacije može se zaključiti da dobijeni imobilisani enzimski preparati zadovoljavaju osnovne uslove za primenu na industrijskom nivou. Primenjena modifikacija površine nanočestica TiO_2 dovela je do značajnog povećanja termičke i operativne stabilnosti kovalentno imobilisanih enzima, što je čini pogodnom za industrijsku proizvodnju dekstrana. Dobijena formulacija za imobilizaciju dekstransaharaze unutar agar-agar filmova predstavlja efikasnu metodu za imobilizaciju dekstransaharaze i njenu primenu u sintezi GLOS, koji imaju široki spektar primena.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pružaju naučnu osnovu za efikasniju upotrebu agro-industrijskih sporednih proizvoda, kao jeftinih i dostupnih sirovina, za fermentacionu proizvodnju dekstransaharaze, čime je stvorena osnova za razvoj procesa proizvodnje ovog enzima uz redukciju troškova.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Miona Miljković je svoje rezultate potvrdila objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog značaja kao i saopštavanjem radova na međunarodnim i nacionalnim skupovima. U okviru izrade ove doktorske disertacije kandidat je prvi autor jednog rada

objavljenom u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jednog rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jednog rada u međunarodnom časopisu (M23), i tri rada saopštena na skupu međunarodnog značaja (M33 i M34).

Spisak objavljenih radova direktno proisteklih iz teze je:

Kategorija M21-rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. **M. Miljković**, V. Lazić, K. Banjanac, S. Davidović, D. Bezbradica, A. Marinković, D. Sredojević, J. Nedeljković, S. Dimitrijević-Branković: Immobilization of dextransucrase on functionalized TiO₂ supports, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1216-1223, 2018 (**IF** (2017) = **3.909**) (ISSN 0141-8130)

Kategorija M22-rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. **M. Miljković**, S. Davidović, M. Carević, Đ. Veljović, D. Mladenović, M. Rajilić-Stojanović, S. Dimitrijević-Branković: Sugar Beet Pulp as *Leuconostoc mesenteroides* T3 Support for Enhanced Dextransucrase Production on Molasses, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180, 1016–1027, 2016 (**IF** (2016) = **1.751**) (ISSN 0273-2289).

Kategorija M23-rad u međunarodnom časopisu

1. **M. Miljković**, S. Davidović, S. Kralj, S. Šiler-Marinković, M. Rajilić-Stojanović, S. Dimitrijević-Branković: Characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* T3, water kefir grains isolate, *Hemijska industrija*, 71, 351-360, 2017 (**IF** (2017) = **0.591**) (ISSN 0367-598X).

Kategorija M33-saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini

1. **M. Miljković**, S. Davidović, D. Mladenović, K. Mihajlovski, S. Dimitrijević-Branković, S. Šiler-Marinković. Molasses and sugar beet pulp as a fermentation media for dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* T3, In: Radoje V. Pantovic, Z.S.M., (ed.). X International symposium on recycling technologies and sustainable development, Bor, Srbija, 4-7. Novembar, 2015, Proceedings, p. 127-132. (ISBN 978-86-6305-037-2).

Kategorija M34-saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. **M. Miljković**, S. Davidović, M. Rajilić-Stojanović, S. Šiler-Marinković, S. Dimitrijević-Branković, Screening for factors affecting dextransucrase production from *Leuconostoc mesenteroides* isolated from water kefir grains using statistical approach, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries - ICOSECS 8, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013, str. 264. (ISBN: 978-86-7132-053-5).
2. **M. Miljković**, S. Davidović, A. Nešić, K. Mihajlovski, S. Dimitrijević, USAGE OF BY-PRODUCTS FROM SUGAR INDUSTRY AS A CHEAP SUBSTRATE FOR DEXTRANSUCRASE PRODUCTION Different treatments of sugar beet pulp for enhanced dextransucrase production on molasses, XXI IUPAC CHEMRAWN CONFERENCE, 6. – 8. April, Rome, Italia, CNR Headquarters Piazzale Aldo Moro, 7, 2016, BOOK OF ABSTRACTS str. 77. (www.iupac-rome2016.it)

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu svega napred izloženog, Komisija smatra da doktorska disertacija Mione Miljković, dipl. biohemičara, pod nazivom „Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema” predstavlja značajan, originalni naučni doprinos u oblasti biohemijskog inženjerstva, što je potvrđeno i objavljivanjem većeg broja radova u relevantnim časopisima međunarodnog značaja, prezentovanjem rezultata istraživanja na konferencijama, kao i proverom originalnosti korišćenjem softvera iThenticate. Kandidatkinja je samostalno i sistematično uradila istraživanja i analizu dobijenih rezultata.

Imajući u vidu kvalitet, obim i naučni doprinos ove doktorske disertacije Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću TMF-a da prihvati ovaj izveštaj i da ga, zajedno sa podnetom disertacijom Mione Miljković, dipl. biohemičara, prihvati, izloži na uvid javnosti i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu.

ČLANOVI KOMISIJE

.....
Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

.....
Dr Vesna Lazić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke Vinča

.....
Dr Dejan Bezbradica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

.....
Dr Mirjana Rajilić-Stojanović, docent
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

.....
Dr Mila Ilić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu,
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Centar za remedijaciju