

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет:** Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Јелене Бебић

Одлуком Научно-наставног већа Технолошко-металуршког факултета бр. 35/185 од 25.06.2020. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену докторске дисертације кандидата Јелене Бебић под насловом

### **Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја**

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 2007/2008.** године, кандидат Јелена Бебић, мастер инж. технологије, је уписала докторске студије на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду. До 2009. године положила је све испите предвиђене планом и програмом студија, са просечном оценом 10,0 током студија, укључујући и завршни испит на тему "Антиоксиданси у отпацама из производње сокова од воћа и поврћа" са оценом 10, чиме је остварила 82 ESPB поена, ментор ред. проф. др Славица Шилер-Маринковић.
- **Школске 2016/2017.** године, након губитка статуса студента, поновно се уписује на 3. годину докторских студија, на исти студијски програм, са ментором Др Дејаном Безбрадицом, ванредним професором.
- **28.02.2019.** кандидат Јелена Бебић, мастер инж. технологије је предложила тему докторске дисертације под називом „Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја“.
- **07.03.2019.** на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду донета је одлука (бр. 35/90) о именовању чланова Комисије за оцену подобности теме и кандидата Јелене Бебић, мастер инж. под насловом „Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја“.
- **11.04.2019.** на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду донета је одлука о прихватању теме докторске дисертације под називом „Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја“, а за ментора је именован ред. проф. Др Дејан Безбрадица (Одлука бр.35/143).

- **22.04.2019.** Веће научних области техничких наука доноси одлуку по којој даје сагласност на предлог теме „Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја“ кандидата Јелене Бебић, мастер инж. (Одлука бр. 61206-1851/2-19).
- **25.06.2020.** на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду донета је одлука о именовању чланова Комисије за оцену докторске дисертације Јелене Бебић, мастер инж. под називом „Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја“ (о длука бр. 35/185 ).

## 1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство и ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија за коју је матичан Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. Ментор је Др Дејан Безбрадица, редовни професор ТМФ-а, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, који је на основу претходно објављених научних радова и научноистраживачког искуства компетентан да руководи изработом ове докторске дисертације.

## 1.3. Биографски подаци о кандидату

Кандидат Јелена Бебић, рођ. Томовић, мастер инжењер технологије, рођена је 19.01.1975. године у Београду, где је завршила Основну школу “Старина Новак” и Пету београдску гимназију "Др Душица Стефановић". Основне студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 1993/1994. године. Дипломирала је на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију ТМФ-а 13.12.2000. године, са оценом 10 на дипломском раду и са просечном оценом у току студија 8,81. Докторске студије на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију уписала је 2007. године, са ментором др Славицом Шилер-Маринковић, редовним професором. До 2009. године, положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија Технолошко-металуршког факултета у Београду са просечном оценом 10,00 укључујући и завршни испит. Након губитка статуса студента, 2016. године поново се уписује на 3. годину докторских студија, ментор др Дејан Безбрадица, редовни професор.

Од 1. новембра 2001. године запослена је као метролог у Савезном заводу за мере и драгоцене метале, Група за физичко-хемијске величине. 2004. године стиче звање саветника, 2009. године звање самосталног саветника, а тренутно је запослена на месту руководиоца Групе за метрологију у хемији, Дирекција за мере и драгоцене метале, Министарство привреде, у звању вишег саветника.

Представник је Србије у више међународних и европских организација из области метрологије (EEURAMET, EURACHEM, VIPM, OIML). Члан је четири стручне комисије за стандарде Института за стандардизацију Србије. Технички је руководилац два Европска метролошка пројекта за истраживање и развој на националном нивоу у оквиру HORIZON 2020 програма Европске комисије (ALCOREF и RHOLIQ). Има више завршених курсева за оцењивача система квалитета и сертификацију, а као технички оцењивач ангажована је од стране четири национална акредитациона тела. Лиценцирани је предавач од стране Европске комисије JRC-IRMM за GrainMiC програм обуке из метрологије у хемији.

Јелена Бебић је коаутор једног поглавља у књизи од међународног значаја (M14), шест радова у међународним часописима (један M21, три M22, два M23), као и у седамнаест саопштења са међународних и националних скупова (четири M33, један M34, дванаест M63).

## **2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ**

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Јелене Бебић написана је на 164 стране, са укупно 6 поглавља, 77 слика, 8 табела и 181 литературним наводом. Докторска дисертација састоји се из следећих поглавља: Увод, Теоријски део, Материјали и методе, Резултати и дискусија, Закључак и Литература, уз изводе на српском и енглеском језику. Кандидат је уз текст дисертације приложио прилоге, биографију и додатке прописане правилима Универзитета о подношењу докторских теза на одобравање. По својој форми и садржају поднети рад задовољава све стандарде Универзитета у Београду за докторску дисертацију.

## 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације описан је значај примене ензима лаказе, као и њене имобилизације у уклањању органских загађујућих материја, са посебним освртом на значај избора ензима, избора носача као и услова имобилизације. Представљен је план истраживања са посебним нагласком на методе имобилизације и различите носаче лаказе, који ће бити примењени и разлоге за њихову примену у припреми нових имобилисаних ензимских препарата са циљем повећане каталитичке активности и могућности поновне употребе у разградњи изабраних органских загађивача.

У **Теоријском делу** је представљен ензим лаказа, његово откриће, природни извори и функција у ћелији, а дат је преглед својстава лаказе кроз приказ класификације, структурних карактеристика и каталитичког механизма, физичко-хемијских карактеристика ензима, ензимске активности. Дат је преглед медијатор система лаказе, њене карактеризације и хетерологне производње, као и примене у разним индустријама (текстилна, прехранбена, медицина, папирна индустрија) и у заштити животне средине. Друго поглавље теоријског дела посвећено је имобилизацији ензима, где су дефинисане методе које се примењују за имобилизацију ензима, као и карактеристике и класификација носача за имобилизацију ензима, са посебним освртом на носаче који су примењени у експерименталном делу за имобилизацију лаказе, односно на аминок-функционализовану наносилику - AFNS, аминок-модификоване лигнинске микросфере A\_LMS и на комерцијалне Lifetech™ носаче, а представљене су и најважније особине имобилисаних ензима. У трећем поглављу теоријског дела дат је приказ органских загађујућих материја, међу којима су издвојене дуготрајне органске загађујуће супстанце, органохлорни пестициди и индустријске боје, односно врсте загађивача чије је уклањање имобилисаним препаратима лаказе истраживано у експерименталном делу дисертације. Дат је и преглед могуће примене лаказе у уклањању испитиваних класа загађивача, односно у детоксификацији и деконтаминацији отпада и биоремедијацији као и у обезбојавању индустријских боја.

У поглављу **Материјали и Методе** наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, а затим су наведене методе коришћене у току експерименталног рада и обраде резултата. Прво су описани услови и методе модификације наночестица силике. Потом су описане методе имобилизације лаказе на AFNS, A\_LMS и на комерцијалне Lifetech™ носаче. Дат је преглед процедура коришћених за квантитативну анализу ензимске активности, за два различита супстрата, концентрације протеина у добијеним имобилисаним ензимским препаратима, као и методе за испитивање врста успостављених интеракција између ензима и носача. Описане су две аналитичке методе гасне хроматографије са масеном детекцијом, коришћене за анализу разградње изабраних пестицида слободном и имобилисаном лаказом, параметри метода и припрема узорака за анализу за сваку методу посебно. Описана је и спектрофотометријска метода која је примењена у анализи разградње одабраних индустријских боја. На крају овог поглавља, представљене су методе које су биле примењене за испитивање поновне употребе имобилисаних препарата лаказе на AFNS и на Lifetech™ ECR8285F.

Поглавље **Резултати и дискусија** састоји се из приказа резултата добијених у експерименталном раду приликом израде ове дисертације, њихову анализу и дискусију која

укључује поређење са резултатима добијеним у радовима из литературе у сличним испитаним системима. Резултати и дискусија састоје се из осам поглавља: Карактеризација лаказе из *Myceliophthora thermophila* са експресијом у *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003), Разградња органохлорних пестицида слободном лаказом, Имобилизација лаказе на AFNS, Разградња линдана лаказом имобилисаном на AFNS, Имобилизација лаказе на аминок-модификоване лигнинске микросфере (A-LMS), Разградња линдана лаказом имобилисаном на A-LMS\_5, Имобилизација лаказе на Lifetech™ носаче и Разградња индустријских боја лаказом имобилисаном на Lifetech™ ECR8285F.

У **првом поглављу** извршена је карактеризација лаказе из *Myceliophthora thermophila* са експресијом у *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003), односно испитан је утицај pH раствора на активност лаказе и одређена је изоелектрична тачка лаказе.

У **другом поглављу** испитан је велики број органохлорних пестицида, у реакцији њихове разградње слободном Novozym® 51003 лаказом, да би се изабрао пестицид код кога је постигнут највећи степен разградње, без пратеће деградације у пуферу, која је детектована у контролном узорку у току извршених експеримената. Извршено испитивање уједно је дало преглед могућности разградње ове врсте приоритетних органских загађујућих супстанци, применом слободне лаказе. Испитани пестициди били су 4,4'-DDT, 4,4'-DDD, метоксихлор, алдрин, диелдрин, ендосулфан I и ендосулфан II, хептахлор, хептахлор-ендо-епоксид изомер A и линдан.

У **трећем поглављу** оптимизирана је имобилизација Novozym® 51003 на AFNS. Испитан је утицај pH на процес имобилизације, са циљем утврђивања pH оптимума имобилисане лаказе као и оптималног pH саме имобилизације. Праћена је кинетика имобилизације (одређивањем концентрације имобилисаних протеина и приноса имобилизације протеина) као и утицај кључних параметара однос концентрације ензима и носача на ефикасност имобилизације. Ови резултати су искоришћени и за постављање хипотеза о механизму имобилизације лаказе на аминок-модификоване наночестице силике. Вршено је и испитивање активности лаказе имобилисане на AFNS као и специфичне активности, уз испитивање оптималног времена имобилизације. Након завршене оптимизације имобилизације лаказе испитана је активност имобилисаног препарата у разградњи линдана.

У **четвртом поглављу** испитана је деградација линдана добијеним имобилисаним препаратом, а дат је и упоредни преглед разградње линдана слободном и имобилисаном лаказом, коришћењем GC-MS методе, током 6 дана трајања реакције. У оквиру овог испитивања, извршена је и процена могућности поновне употребе добијеног препарата у уклањању линдана, испитивањем у 7 реакционих циклуса.

У **петом поглављу** испитана је имобилизација Novozym® 51003 лаказе на A-LMS. Извршен је избор оптималног носача, од две испитане врсте микросфера (A-LMS\_5 и A-LMS\_10), а за изабрани носач A-LMS\_5 извршена је оптимизација имобилизације, одређивањем најважнијих параметара имобилизације, као што су кинетика адсорпције, принос имобилизације протеина, активност имобилисаних препарата и принос имобилизације активности. Добијени резултати коришћени су за постављање хипотеза о механизму имобилизације и утицају модификације носача на његову примену у имобилизацији лаказе. Као и у претходном испитивању имобилизације лаказе на AFNS, такође је испитана и могућност примене имобилисаног препарата у деградацији пестицида лидана.

У **шестом поглављу** испитана је разградња линдана лаказом имобилисаном на A-LMS\_5, а дат је и упоредни преглед разградње линдана слободном лаказом и лаказом имобилисаном на AFNS и на A-LMS\_5, коришћењем GC-MS методе, такође током 6 дана трајања реакције. Добијени резултати дају могућност избора најефикаснијег носача, за примену у деградацији линдана.

У **седмом поглављу** испитивана је примена осам носача из серије Lifetech™ ECR за имобилизацију лаказе из *Trametes versicolor*. Изабрани су носачи са различитим поларностима, порозношћу и функционалним групама и са добрим механичким својствима. Вршено је поређење шест аминок-функционализованих носача из ове серије, који се разликују

у пречницима пора, типу амино група и дужини алкилних ланаца који повезују амино групу са површином носача. За најперспективнији носач из ове групе, оптимизовани су кључни фактори имобилизације, као што су рН, време имобилизације и концентрација понуђених протеина. Такође су испитана и два порозна носача, један хидрофобни и један епоксидно-функционализовани носач из исте серије носача, ради утврђивања могућности имобилизације путем хидрофобне адсорпције и ковалентног везивања, као и могуће примене у разградњи индустријских боја. Да би се оптимизовала ковалентна имобилизација лаказе на изабрани Lifetech™ ECR8285F епоксидно-функционализовани носач, који се показао као најперспективнији на основу добијених резултата, испитана је активност имобилисане лаказе, специфична активност, концентрација имобилисаних протеина и принос имобилизације. Поред тога, испитиван је и механизам имобилизације ензима на ECR8285F.

У **осмом поглављу** имобилисани препарат лаказе из *T. versicolor* на ECR8285F примењен је у обезбојавању 4 одабране боје: Lanaset® Violet B, Lanaset® Blue 2R, бромтимол плава и бромкрезол зелена, које имају сложену ароматичну хемијску структуру, а представљају органске загађујуће материје. Испитан је степен деколоризације боја, као и могућност поновне употребе добијеног имобилисаног препарата у 7 реакционих циклуса. Током овог испитивања, осим ензимске разградње боја, примењена је и праћена, адсорпција боја на носач.

У поглављу **Закључци** 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

Ензим лаказа, из групе оксидо-редуктаза, има велики потенцијал за примену у разним областима индустрије и заштите животне средине. Особина лаказа, која их чини интересантним ензимима за потенцијалну индустријску примену је њихова ниска специфичност према супстрату. Лаказе успешно разграђују органске супstrate, односно ароматична тиолна једињења, анилине, а првенствено феноле, као и многа друга једињења, што пружа могућност њихове употребе и у биоремедијацији, односно уклањању органских загађујућих материја. Загађивачи, чија је разградња лаказом испитивана у овој дисертацији, су сложена хемијска једињења, отпорна на биолошку, хемијску и фотолитичку деградацију веома широко распрострањена у животној средини, услед чега се нарушава њен квалитет, а улазећи у ланац исхране, такође и здравље људи. Токсична су и у врло ниским концентрацијама, а услед умерене испарљивости, могу се наћи на подручјима где никада нису ни била коришћена, најчешће у земљишту и седиментима, због њихове релативно слабе растворљивости у води. Њихово присуство је и даље доказано у свим деловима животне средине, па и у храни, што представља велики проблем савременог друштва, али и изазов за решавање истог, иако је њихова производња и употреба у већини земаља света забрањена или контролисана и строго законски регулисана. Потенцијални извори органских загађивача су: неодговарајућа примена пестицида, депоније, индустријске отпадне воде или већа изливања, отпадне воде из нафтне индустрије и други. У законској регулативи Републике Србије, већина ових загађивача спадају у дуготрајне органске загађујуће супстанце, односно перзистентне органске полутанте, од којих поједини, као што су органохлорни пестициди, представљају приоритетне органске загађујуће супстанце. Да би се лаказа могла успешно примењивати у биоремедијацији, мора се обезбедити њена стабилност под најчешће неповољним процесним условима. Проблем недовољне стабилности ензима, може се превазићи применом технике имобилизације ензима, којом се обезбеђује и виšekратна употреба имобилисаног препарата и боља физичка сепарација из реакционог медијума, као и

друге побољшане карактеристике ензима. Да би имобилизација ензима била ефикасна, потребно је да буду одговарајући услови имобилизације и да врста носача и функционалне групе на његовој површини буду прилагођени структури лаказе. Ово се постиже оптимизацијом процеса имобилизације, који је специфичан за сваку појединачну комбинацију ензима и носача.

Из свих наведених разлога, у оквиру ове дисертације, извршено је испитивање могућности разградње различитих органских загађујућих материја, од којих 9 из класе органохлорних пестицида и 4 индустријске боје, лаказама из *Myceliophthora thermophila* са експресијом у *Aspergillus oryzae* (Novozym<sup>®</sup> 51003) и из *Trametes versicolor*, како слободним, тако и имобилисаним. Имобилизација лаказа је вршена на непорозне наночестице аминокиселинофункционализоване наносиле (AFNS); порозне некомерцијалне органске носаче од природног материјала, односно две врсте аминокиселино-модификованих лигнинских микросфера (A-LMS) и 8 комерцијално доступних Lifetech<sup>™</sup> органских, синтетских, порозних носача. Примењене методе имобилизације биле су адсорпција и ковалентна имобилизација, а за све добијене имобилисане препарате најбољих карактеристика, из одабраних група носача, извршена је оптимизација имобилизације и испитана је њихова примена у више поновних употреба у разградњи изабраних загађивача. Код свих испитаних органохлорних пестицида детектована је разградња слободном лаказом, а највећи степен деградације постигнут је код линдана, који је коришћен као супстрат у даљим испитивањима. Лаказа имобилисана на AFNS разграђивала је линдан већом брзином од слободне, уз очување активности, а лаказа имобилисана на A-LMS\_5 имала је продужену активност, док је деградација линдана била ефикаснија него у случају слободне лаказе или лаказе имобилисане на AFNS. Из серије Lifetech<sup>™</sup> носача, најбоље карактеристике показао је имобилисани препарат са епокси/бутил метакрилатни носачем, који је затим, успешно примењен у разградњи индустријских боја, са постигнутим готово потпуним обезбојењем узорака. Сви добијени и представљени резултати потврђују велике могућности примене имобилизације лаказе, на различите категорије носача, у биоремедијацији, за разградњу органских загађујућих материја.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитиран је 181 литературни навод, од којих већина припада међународним часописима највишег ранга, који је омогућио да се представи стање у испитиваној научној области 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 лаказе имобилисане на носаче различитих карактеристика, у биоремедијацији земљишта и вода. 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 актуелног стања у овој области истраживања.

### 3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Сви резултати приказани у овој докторској дисертацији су доказани применом адекватних експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим процедурама из литературе, као и одговарајућом анализом и обрадом података.

Модификација пирогене нано-силике Aerosil<sup>®</sup> 380 (FNS) вршена је према методи претходно описаној у релевантним литературним изворима, а структурна карактеризација наночестица силике извршена је методом FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) спектроскопије.

Концентрација уведених аминокиселина група, приликом модификовања носача, одређивана је коришћењем метода титрације помоћу NaOH.

Имобилизација лаказе на AFNS, као и на A-LMS је извршена применом модификованих метода које се могу пронаћи у релевантним литературним изворима, као и применом оригиналних процедура оптимизованих у оквиру овог експерименталног рада. Имобилизација лаказе на Lifetech™ ECR носаче, рађена је према препорукама произвођача и применом оригиналних оптимизованих процедура.

За анализу добијених имобилизованих ензимских препарата примењене су стандардне спектрофотометријске методе: за одређивање активности лаказе праћена је реакција оксидације 2,2'-азино-bis-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине), ABTS-a и синрингалдазина (4-хидрокси-3,5-диметокси-бензалдехид-азин). За одређивање концентрације имобилизованих протеина коришћена је метода по Бредфорду (Bradford).

Да би се испитао тип интеракције које су формиране између лаказе и изабраних носача у експерименту десорпције, имобилизовани препарат третиран је одвојено са 1 % раствором Triton™ X-100 и 1 M раствором раствором CaCl<sub>2</sub>, након чега је одређивана преостала активност стандардном спектрофотометријском методом.

За анализе свих испитиваних органохлорних пестицида, односно за квантификацију њихове разградње слободном и имобилизованом лаказом, коришћена је гасно-хроматографска метода са масеном спектрометријом GC-MS. За ове анализе коришћена је Zebtron™, ZB-5 капиларна колона, димензија 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm. Примењене су две различите методе, преузете из литературе и модификована према коришћеној опреми. Као носећи гас коришћен је хелијум, чистоће 5.0. Запремина инјектованих узорка била је 1 μl, а коришћена опрема за узорковање је била аутоматизовани аутосемплер. Анализе су вршене у Scan и SIM режиму рада, односно континуалним снимањем свих спектра, као и селективним праћењем спектра изабраних јона, са скенираним опсезима маса од 50 m/z до 650 m/z. За интеграцију површине пикова, коришћена је аутоматска интеграција у софтверу GCMS Solution.

Обезбојавање индустријских боја праћено је у одређеним временским интервалима, а промена боје узорка је одређивана спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на λ<sub>max</sub> за сваку боју, стандардном методом.

#### 3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа литературних података и експерименталних резултата приказаних у оквиру ове дисертације, може се закључити да је остварен значајан допринос у примени имобилизоване лаказе за уклањање органских загађујућих материја. Установљено је да припрема оптималног носача, како комерцијалног, модификованог комерцијалног или синтетисаног од природних материјала, а затим модификованог, мора бити циљан и специфичан процес који зависи од карактеристика ензима, првенствено распореда аминокиселинских остатака на његовој површини. Приликом испитивања могућности деградације органохлорних пестицида слободном лаказом, код свих испитаних пестицида детектована је ензимска разградња, а највећи степен деградације постигнут је код линдана, који је коришћен као супстрат у даљим испитивањима.

Лаказа имобилизована на AFNS разграђивала је линдан већом брзином од слободне, уз очување активности, а лаказа имобилизована на A-LMS\_5 имала је продужену активност и деградација линдана била је ефикаснија него у случају слободне лаказе или лаказе имобилизоване на AFNS.

Из серије Lifetech™ носача, најбоље карактеристике показао је имобилизовани препарат са епокси/бутил метакрилатни носачем, који је успешно примењен у разградњи индустријских боја, са постигнутим готово потпуним обезбојењем узорка.

Сви добијени резултати потврђују велике могућности примене имобилизације лаказе, на различите категорије носача, у биоремедијацији, за разградњу органских загађујућих материја.

### 3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Јелена Бебић је мастер 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. Експериментални део ове дисертације рађен је, како на ТМФ-у, тако и у лабораторијама Дирекције за мере и драгоцене метале, где је кандидат запослен. Кандидат има изузетну склоност ка експерименталном раду и инжењерски приступ у развоју и реализацији експерименталних и аналитичких 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

- Карактеризацијом лаказе из *Myceliophthora thermophila* са експресијом у *Aspergillus oryzae* (Novozym<sup>®</sup> 51003), утврђен је рН оптимум на приближно рН 6,8, а изоелектрична тачка лаказе, pI, имала је вредност од 4,0. Висока активност Novozym<sup>®</sup> 51003 лаказе, у широком распону рН вредности омогућила је да се имобилизација ензима врши у већем распону рН вредности.
- Слободна лаказа је показала могућност разградње свих анализираних загађивача из групе органохлорних пестицида што пружа потврду њене потенцијалне примене у биоремедијацији. Пестицид код кога је постигнут највиши степен разградње од 51 % био је линдан, а утврђено је и да је оптимално реакционо време од 6 дана.
- Оптимизацијом имобилизације Novozym<sup>®</sup> 51003 лаказе на AFNS, добијени оптимизовани услови су рН 5,0, и концентрација понуђених протеина од 160 mg по g носача, а имобилизацијом методом физичке адсорпције ензима на носач, која се одвија брзо, са везивањем лаказе у једном слоју на носач, очувала се висока активност лаказе.
- Добијени имобилисани препарат коришћен је у разградњи пестицида линдана, где је након 6 дана реакције, разграђено 43,2 % линдана, рачунато релативно у односу на почетну концентрацију, већом брзином него слободна лаказа. Приликом испитивања могућности поновне употребе овог препарата, након 7 поновних употреба, имобилисана Novozym<sup>®</sup> 51003 лаказа задржала је 70 % почетне активности, што представља потврду да добијени имобилисани препарат има добар потенцијал за вишекратну примену у разградњи линдана.
- Приликом испитивања могућности за коришћење аминокиселинских лигнинских микросфера (A-LMS), као носача за имобилизацију Novozym<sup>®</sup> 51003 лаказе, од две испитане врсте A-LMS микросфера (A-LMS\_5 и A-LMS\_10), са различитим карактеристикама, на основу параметара ефикасности имобилизације, њихове највеће вредности добијају се у случају имобилизације лаказе на A-LMS\_5 микросфере. рН оптимум за имобилизацију лаказе на A-LMS\_5 био је 5,0, највећа концентрација имобилисаних протеина, након једног сата, износила је приближно 35 mg/g, а највећи принос имобилизације активности и специфичне активности, добијени су за концентрацију понуђених протеина од 70 mg/g носача, за време имобилизације од 4 h. Утврђено је да се везивање лаказе на овај носач врши у подједнакој мери, електростатичким и хидрофобним интеракцијама.
- Приликом испитивања добијеног препарата у разградњи линдана, после шестог дана реакције, преостала концентрација линдана у узорку, у односу на почетну, износила је 22,4 %. Лаказа имобилисана на A-LMS\_5, у односу на линдан као супстрат, има продужену активност а сама деградација је ефикаснија него у случају слободне лаказе или лаказе имобилисане на AFNS. Од ова два испитана носача, A-LMS\_5 има боље изгледе за



примену у имобилизацији Novozym® 51003 лаказе, за потенцијалну примену у разградњи инсектицида линдана.

- Испитивањем серије комерцијалних Lifetech™ ECR носача, највећа активност имобилисаног препарата из групе аминокиселинских носача, од 6 испитаних носача, била је код порозног Lifetech™ ECR8309F носача, већих пора и краће С2 ножице, код које је добијена активност имобилисане лаказе износила 22320 U/g носача. Оптимизацијом имобилизације, утврђено је да је рН оптимум 5,0, а оптимално време имобилизације један сат. Праћењем концентрације имобилисане активности и специфичне активности, утврђено је да је оптимална почетна концентрација протеина 7 mg по g носача.
- Од друга два испитана Lifetech™ носача, од којих је један хидрофобни и један епоксидно-функционализовани носач, препарат са лаказом имобилисаном на епокси/бутил метакрилатни носач (Lifetech™ ECR8285F) показао је преко три пута већу активност. Оптимизацијом имобилизације, добијен је имобилисани препарат са активношћу од 118929 U/g носача. На овај носач, 68 % молекула лаказе везано је хидрофобним интеракцијама, док је преосталих 32 % молекула ензима везано ковалентним везама. Потврда успостављених ковалентних веза између ензима и носача, као и велике добијене активности имобилисаног препарата, издвојили су га од осталих, као најперспективнијег за испитивање његове примене у разградњи индустријских боја.
- Добијени имобилисани препарат је испитан у разградњи четири индустријске боје. Реакција разградње боја била је веома брза, а постигнути степен деколоризације био у опсегу од 88 % до 96 % након 4 сата, са више од 80% обезбојења после првих 45 минута. Испитивањем поновне употребе имобилисаних препарата, након 7 реакционих циклуса, проценат обезбојења остао је висок, од 58% до 80%, што потврђују да добијени препарат има значајну оперативну стабилност и добре изгледе за економски одрживу употребу у пречишћавању индустријских отпадних вода.

#### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне научне литературе која описује имобилизацију лаказе на конвенционалне носаче, модификоване носаче нано-димензија и модификоване носаче од природних материјала, као и разматрањем резултата проистеклих из истраживања у оквиру ове докторске дисертације може се закључити да добијени имобилисани препарати у потпуности задовољавају неопходне услове за примену на индустријском нивоу. Примењене имобилизационе технике довеле су до значајног повећања активности и стабилности имобилисаних ензима, као и њиховог афинитета према реакцији оксидације изабраних органских загађујућих материја. Такође, омогућена је и њихова поновна употреба у реакционим системима, што представља добар предуслов за њихову ширу примену у области биоремедијације. Сви имобилисани препарати лаказе показали су значајан степен разградње изабраних органских загађујућих материја.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Јелена Бебић је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су до сада у оквиру три рада у научним часописима међународног значаја (два рада у M22 и један у M23). Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије, као и у области метрологије у хемији у оквиру којих је коаутор једне монографије, и три рада у међународним часописима (један M21, један M22, један M23), као и у седамнаест саопштења са међународних и националних скупова (четири M33, један M34, дванаест M63).

#### Категорија M22:

1. **Bebić J**, Banjanac K, Ćorović M, Milivojević A, Simović M, Marinković A, Bezbradica D.: Immobilization of laccase from *Myceliophthora thermophila* on functionalized silica nanoparticles: Optimization and application in lindane degradation, -*Chinese Journal of Chemical Engineering*, Vol. 28, Issue 4, pp. 1136-1144, 2020 (IF= **2.627**) (ISSN 1004-9541). <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.12.025>
2. **Bebić J**, Banjanac K, Rusmirović J, Ćorović M, Milivojević A, Simović M, Marinković A, Bezbradica D.: Amino-modified kraft lignin microspheres as a support for enzyme immobilization, -*RSC Advances*, Vol. 10, pp. 21495-21508, 2020 (IF= **3.119**) (ISSN 2046-2069) DOI: <https://doi.org/10.1039/d0ra03439h>

#### Категорија M23:

1. **Bebić J**, Banjanac K, Ćorović M, Milivojević A, Simović M, Vukoičić A, Mitrović D, Bezbradica D.: Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on Lifetech™ supports for applications in degradation of industrial dyes, - *Hemijaska industrija*, Vol. 74, No 3, pp. 197-209, 2020 (IF=0.407) (ISSN 0367-598X) DOI: <https://doi.org/10.2298/HEMIND200320016B>

#### **Остали научни радови кандидата**

#### Монографска студија/поглавље у књизи M12 или рад у тематском зборнику међународног значаја (M14)

1. I. Altieri, S. Barbizzi, **J. Bebic**, M. Belli, E. Amico di Meane, G. Horvat N. L. Lazić, S. Marinčić, M. Mehović, M. Memić, A. Menditto, T. Muhić-Šarac, M. Patriarca, G. Pistone, M. Sega, A. Semerar, M. Simonič, B. Tepuš: *Practical Examples on Traceability, Measurement Uncertainty and Validation in Chemistry*, Vol 2. Publication Office of the European Union, 95-131, 2011, ISBN: 978-92-79-18998-2, DOI : 10.2787/36024, ISSN: 1018-5593

#### Категорија M21

1. J. Viallon, P. Moussay, R. Wielgosz, **J. Bebic**, J. E Norris, and F. Guenther.: "Final Report, on-Going Key Comparison BIPM.QM-K1: Ozone at Ambient Level, Comparison with DMDM, July 2015.", *Metrologia* 53 08006., 1-14, 2016, IF(2016)= 3,411

#### Категорија M22

1. M. Archer, M. Fernandes-Whaley, R. Visser, J. de Vos, S. Prins, A. Rosso, M. Ruiz de Arechavaleta, I.Tahoun, E. Kakoulides, C. Luvonga, G. Muriira, E. Naujalis, O. Bin Zakaria, M. Buzoianu, **J. Bebic**, B. Achour Mounir, N. Huy Thanh: *Final report on AFRIMETS.QM-K27: Determination of ethanol in aqueous matrix*. *Metrologia* 50 08020 1-40, 2013., doi: <https://doi.org/10.1088/0026-1394/50/1A/08020> , IF(2013)= 1,653

#### Категорија M23

1. D. Bezbradica, **J. Tomovic**, M. Ristic, M. Vukasinovic, S. Siler-Marinkovic: "Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja montana* L. collected in Serbia&Montenegro", *J. Essent. Oil Res.* 17, 462-465, 2005. IF(2005)= 0,367

#### Категорија M33

1. A. Furtado, J. Pereira, M. Schiebl, G. Mares, G. Popa, P. Bartos, **J. Bebic**, E. Lenard, A. Alic, S. Alisic, P. Neuvonen, H. Wolf, G. Sariyerli, A. Bescupschii, B. Laky: *Establishing traceability for liquid density measurements in Europe: 17RPT02-rhoLiq a new EMPIR*

- joint research project*, Journal of Physics: Conference Series 1065 (2018) 082013, 1-5, 2018, doi:10.1088/1742-6596/1065/8/082013, ISSN: 1742-6588
2. **J. Bebic**, D. Nikolic: *Existing National/Reference Measurement Capability for Gas Composition Measurements in Serbia and Montenegro*, "Balkan Workshop Reference Infrastructure for Gas measurements in Balkan Countries", Zbornik radova, Sofija, 2004.
  3. D. Nikolic, **J. Bebic**, T. Koldzic: *Realizacija akreditovane laboratorije u JKP "Beogradske elektrane" Beograd za etaloniranje analizatora gasova za merenje emisija zagađujućih gasova iz stacionarnih izvora*, "Balkan Workshop Reference Infrastructure for Gas measurements in Balkan Countries", Zbornik radova, Sofija, 2004.
  4. **Bebic J**, Gazevic L, Bläul C, PROLAB SOFTWARE FOR DATA EVALUATION OF INTERLABORATORY STUDIES, *International Journal "Advanced Quality"*, Vol. 44, No. 3, pp. 2016. DOI: 10.25137/IJAQ.n3.v44.y2016.p23-28

#### Категорија М<sub>34</sub>

1. R. Philipp, K. Topal, M. Calzado, **J. Bebic**, B. Lalere, *EMPIR project ALCOREF - certified forensic alcohol reference materials*, Izlaganje na Kongresu BERM-15 International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials, Berlin, 2018.

#### Категорија М<sub>63</sub>

1. **J. Bebić**: *Sledivost analitičkih merenja do međunarodnog i nacionalnog nivoa*, Seminar "Laboratorijski menadžment i akreditacija prema ISO 17025 standardu", Zbornik radova, Beograd, 2003.
2. **J. Bebić**, D. Nikolić: *Međunarodna preporuka OIML R 99/ISO 3930 za ispitivanje analizatora izduvnih gasova iz benzinskih motora*, "Peto savetovanje o unapređenju policijske prakse u bezbednosti saobraćaja", Zbornik radova, Kladovo, 2007.
3. **J. Bebić**: *Metrologija u hemiji u Evropi*, Kongres Metrologa, Zbornik radova Zlatibor, 2007.
4. D. Nikolić, **J. Bebić**: *Međunarodna preporuka OIML R 126 za ispitivanje etilometara*, Peto savetovanje o unapređenju policijske prakse u bezbednosti saobraćaja, Zbornik radova, Kladovo, 2007.
5. **Bebić, J.**: *Klasifikacija referentnih materijala, njihova proizvodnja i upotreba*. Singidunum revija, 8 (2), 173-179, 2011, ISSN: 1820-8819
6. **J. Bebic**, Koldzic T.: *Measurement uncertainty of calibration of gas analyzers for stationary sources emissions and evaluation of performance of accredited laboratory in this field*, Metrology Congress 2013, Proceedings, Borsko jezero, 2013.
7. N. Škundrić, **J. Bebić**, *POTVRĐIVANJE REFERENTNIH RASTVORA ETANOLA U VODI*, Zbornik radova, International convention on quality, JUSK, Belgrade, Serbia, 2013.
8. **J. Bebić**, N. Škundrić, *ETALONIRANJE FOTOMETARA ZA MERENJE NIVOA AMBIJENTALNOG OZONA U DIREKCIJI ZA MERE I DRAGOCENE METALE*, Zbornik radova, International convention on quality, JUSK, 107-113, 2015, Beograd, Srbija
9. **J. Bebić**, V. Škerović: *Realizacija Kukove metode etaloniranja areometara (metoda merenja na hidrostatičkoj vagi) u Direkciji za mere i dragocene metale*, Kongres metrologa 2019., Zbornik radova, Šabac 2019.
10. K. Banjanac, M. Milošević, J. Zukan Banović, **J. Bebić**: *Ispitivanje homogenosti sertifikovanih referentnih rastvora etanola u vodi u Direkciji za mere i dragocene metale*, Kongres metrologa 2019., Zbornik radova, Šabac 2019.
11. Л.Гажевић, К. Бањанац, А. Салтиров, **Ј. Бебић**, "Успостављање методе за законску метролошку контролу анализатора за мерење садржаја протеина у житу у Дирекцији за мере и драгоцене метале" "Конгрес метролога 2019. Шабац, октобар 2019.
12. Д. Милићевић, Б. Лаштро, Ј. Лазаревић, С. Симић, **Ј. Бебић**, Ј. Павловић, Ј. Пантелић-Бабић, П. Ђурић, „Нови међународни систем јединица -SI редефиниција килограма,

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Јелене Бебић, мастер инж. технологије под називом „**Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја**” 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. 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 „**Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја**“ кандидата Јелене Бебић прихвати, изложи на увид јавности и упути 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

.....  
Др Љиљана Мојовић, редовни професор  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
Др Александар Маринковић, ванредни професор  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
Др Милица Симовић, научни сарадник  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
Др Катарина Бањанац, научни сарадник  
Универзитет у Београду, Иновациони центар  
Технолошко-металуршког факултета

.....  
Др Јелена Русмировић, научни сарадник  
Војнотехнички институт у Београду