

**Predmet:** Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Mr Olivere L. Prodanović, dipl. biologa.

Odlukom 35/293 br. od 09.07.2015. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Mr Olivere L. Prodanović pod naslovom

**RAZVOJ IMOBILISANIH SISTEMA PEROKSIDAZE IZ RENA (*Armoracia rusticana*) ZA POLIMERIZACIONE REAKCIJE I UKLANJANJE FENOLA IZ OTPADNIH VODA**

Posle pregleda dostavljene Disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa Kandidatom, Komisija je sačinila sledeći

**R E F E R A T**

**1. UVOD**

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

**29.11.2012.** – Kandidat Mr Olivera L. Prodanović, dipl. biolog predložila je temu doktorske disertacije pod nazivom: „Razvoj imobilizovanih sistema peroksidaze iz rena *Armoracia rusticana* za polimerizacione reakcije i uklanjanje fenola iz otpadnih voda“, a Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu usvojilo Komisiju za ocenu naučne zasnovanosti predložene teme (odluka br. 35/442 od 28.12.2012. godine).

**28.02.2013.**– Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, na osnovu podnetog izveštaja Komisije, doneta je Odluka o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Mr Olivere L. Prodanović, dipl. biologa, pod nazivom „Razvoj imobilisanih sistema peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*) za polimerizacione reakcije i uklanjanje fenola iz otpadnih voda“ i za mentora ove doktorske disertacije imenovana je dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor TMF-a.

**15.04.2013.**– Na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Mr Olivere L. Prodanović, dipl. biologa, pod nazivom „Razvoj imobilisanih sistema peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*) za polimerizacione reakcije i uklanjanje fenola iz otpadnih voda“.

**09.07.2015.**– Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je Odluka o imenovanju Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Mr Olivere L. Prodanović, dipl. biologa, pod nazivom „Razvoj imobilisanih sistema peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*) za polimerizacione reakcije i uklanjanje fenola iz otpadnih voda“.

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove disertacije pripadaju naučnoj oblasti Hemija i hemijska tehnologija (uža naučna oblast Biotehnologija i biohemijsko inženjerstvo) za koju je matična ustanova Tehnološko-

metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Za mentora je izabrana dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor TMF-a koja je na osnovu objavljenih publikacija i iskustva kompetentna da rukovodi izradom ove doktorske disertacije.

### 1.3. Biografski podaci o kandidatu

Olivera Prodanović, magistar multidisciplinarnih nauka Univerziteta u Beogradu, rođena je 13. novembra 1973. godine u Čačku. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Lučanima 1992. godine. Studije na Biološkom fakultetu u Beogradu (smer Zaštita, obnova i unapređivanje životne sredine) upisala je iste godine i diplomirala 18.07.2000. godine na Katedri za Ekologiju i geografiju životinja, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu sa ocenom na diplomskom radu 10 (deset) i prosečnom ocenom u toku studija 8,26.

Magistarske studije na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, odsek Biofizika, upisala je školske 2003/04. godine. Treba imati u vidu da je tokom rada na magistarskoj tezi boravila dve godine na porodiljskom i dve godine na neplaćenom odsustvu u Nemačkoj. Položila je sve ispite predviđene planom i programom magistarskih studija sa prosečnom ocenom 9,28 i odbranila magistarsku tezu 27.04.2010. godine pod nazivom „ANTIOKSIDATIVNI ENZIMI TOKOM KLIJANJA SEMENA PANČICEVE OMORIKE (*Picea omorika* (Panč) *Purkinje*) U FIZIOLOŠKIM I USLOVIMA STRESA IZAZVANOG VISOKIM KONCENTRACIJAMA KADMIJUMA“.

Od 16.04.2004. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač- saradnik izabrana je 24. aprila 2009. godine. Tokom dosadašnjeg istraživačkog rada na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, učestvovala je na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, broj 1911 - „Ćelijski odgovor na stres kod drveća izazvan zagađenjem: Mogućnost primene u biomonitoringu životne sredine“ (2004.-2005.), i na projektu broj 143043 - „Ispitivanja novih biosenzora za monitoring i dijagnostiku biljaka“ (2006.-2010.), a u novom projektnom ciklusu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije angažovana je na projektu 173017 – „Ispitivanje odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom“ (2011.-2014.).

Čita, piše i govori engleski i nemački jezik.

## **2. OPIS DISERTACIJE**

### 2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Mr. Olivera Prodanović napisana je na 139 stranica, sa ukupno 10 poglavlja, 80 slika, 21 tabelom i 118 literaturnih navoda. Doktorska disertacija sadrži sledeća poglavlja: Uvod, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultate i diskusiju, Zaključna razmatranja i Literaturu, uz izvode na srpskom i engleskom jeziku.

### 2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U **Uvodu** disertacije data su osnovna razmatranja značaja primene peroksidaza i imobilizovanih enzima u biotehnologiji. Prikazane su osnovne prednosti primene peroksidaza u biokatalizi kao i prednosti primene imobilisanih sistema peroksidaza u odnosu na rastvorne peroksidaze. Takođe je predstavljeno trenutno naučno i industrijsko stanje u ovoj oblasti. Na kraju poglavlja su predstavljeni ciljevi rada sa planom istraživanja.

U **Teorijskom delu** u **prvom poglavlju** napravljen je pregled primene peroksidaza u biotehnologiji kao i pregled strukturnih i kinetičkih osobina biljnih peroksidaza sa posebnim osvrtom na

peroksidazu iz rena. U **drugom poglavlju** su sistematski prikazane hemijske i fizičke metode imobilizacije enzima. Opisane su glavne hemijske metode aktivacije karboksilnih, hidroksilnih i amino grupa, kako na enzimu, tako i na nosačima za imobilizaciju. Takođe su opisani različiti nosači koji se koriste za razvoj imobilisanih enzimskih sistema. Na kraju ovog poglavlja su opisane osnovne fizičko hemijske karakteristike imobilisanih enzimskih sistema i kinetički parametri koji se koriste za procenu efikasnosti imobilizacije enzima. U **trećem poglavlju** su detaljnije opisane karakteristike makroporoznih nosača koji se koriste kao nosači za imobilizaciju enzima. Posebno su opisane osobine komercijalnog makroporoznog glicidil-metakrilata Eupergita i makroporoznog kopolimera glicidil-metakrilata i etilenglikol-dimetakrilata kao nosača za imobilizaciju enzima koji su i korišćeni u eksperimentima ove doktorske disertacije. Takođe su navedeni literaturni primeri primene makroporoznih nosača za imobilizaciju peroksidaza. U **četvrtom poglavlju** teorijskog dela su date fizičko hemijske osobine alginata, prirodnog polisaharida izolovanog iz biljnog ćelijskog zida algi kao i metode njegove hemijske modifikacije u cilju dobijanja hidrogelova za imobilizaciju enzima. Dat je i pregled literaturnih radova koji se bave primenom alginata u imobilizaciji peroksidaza.

**Eksperimentalni deo** se sastoji od poglavlja: Materijali i Metode. U ovom poglavlju su navedeni svi materijali korišćeni u ovim istraživanjima kao i metode i uslovi koji su korišćeni u eksperimentalnom radu, prema redosledu eksperimentalnog istraživačkog rada. Prvo su opisani uslovi i metode za hemijsku modifikaciju alginata perjodatom i tiraminom. Date su metode koje su korišćene za njegovu strukturnu karakterizaciju kao što je određivanje fenolnih grupa spektrofotometrijom, određivanje jonizabilnih grupa kiselo baznom titracijom i dokazivanje hemijske modifikacije alginata infracrvenom spektroskopijom (FTIR). Nakon toga su opisane procedure za imobilizaciju peroksidaze iz rena u hemijski modifikovanom alginatu, kao i metode merenja enzimske aktivnosti rastvorne i imobilisane peroksidaze. U okviru procedura za merenje aktivnosti opisani su detaljnije postupci određivanja kinetičkih parametara peroksidaze kao što su  $K_m$ , pH optimum, temperaturna stabilnost i stabilnost u organskom rastvaraču. Nakon toga je opisana upotreba imobilisane peroksidaze u šaržnom reaktoru i procedure za merenje sadržaja fenola. Opisane su i metode sinteze serije makroporoznih kopolimera glicidil-metakrilata i etilenglikol-dimetakrilata, njihove hemijske modifikacije i određivanja koncentracije jonizabilnih grupa nakon toga. Date su procedure za sve četiri metode korišćene pri imobilizaciji peroksidaze kao što su imobilizacija preko epoksidne grupe, glutaraldehidna imobilizacija, perjodatna imobilizacija i imobilizacija karbodiimidima (EDAC). Na kraju su opisane sve metode kinetičke karakterizacije imobilizata peroksidaze na makroporoznim nosačima kao i pri karakterizaciji imobilizata peroksidaze u alginatu.

Poglavljje **Rezultati i diskusija** obuhvata prikaz rezultata dobijenih u eksperimentalnom radu u ovoj disertaciji, njihovu analizu i diskusiju koja uključuje poređenje sa rezultatima dobijenih u radovima iz literature u različitim ili sličnim ispitanim sistemima. Rezultati i diskusija se sastoje od četiri poglavlja: 1) Kovalentna imobilizacija peroksidaze na makroporoznom glicidil-metakrilatu veličine čestica od 150 do 500 mikrometara, 2) Kovalentna imobilizacija peroksidaze na makroporoznom glicidil-metakrilatu veličine čestica od 2 do 2,5 mikrometra, 3) Imobilizacija peroksidaze u mikročesticama alginata, i 4) Optimizacija procesnih parametara za uklanjanje fenola iz vodenih rastvora. U **prvom poglavlju** predstavljen je postupak optimizacije parametara za imobilizaciju peroksidaze na makroporoznom glicidilmetakrilatu sa veličinom čestica od 150 do 500  $\mu\text{m}$  u pogledu metode imobilizacije (glutaraldehidna i perjodatna) i količine dodatog enzima. Predstavljene su kinetičke osobine dobijenih imobilizata peroksidaze kao što su specifična aktivnost imobilizata, temperaturna stabilnost na 65 °C, stabilnost u 80% (v/v) dioksanu, pH optimum, Mihaelisova konstanta  $K_m$  i operativna stabilnost u šaržnom reaktoru za oksidaciju pirogalola. U **drugom poglavlju** su predstavljeni rezultati dobijeni optimizacijom parametara imobilizacije peroksidaze iz rena na seriji makroporoznih glicidil-metakrilata sa veličinom čestica od 2 do 2,5  $\mu\text{m}$  koristeći četiri metode imobilizacije epoksidnu, glutaraldehidnu, perjodatnu i karbodiimidnu metodu. Prikazan je uticaj količine dodatog enzima i vrste korišćenog makroporoznog polimera sa

različitim površinskim karakteristikama na specifičnu aktivnost imobilisane peroksidaze i prinosa imobilizacije. **Treće poglavlje** prikazuje rezultate dobijene pri razvoju novih hemijski modifikovanih alginata za primenu u imobilizaciji peroksidaze iz rena. Opisane se metode perjodatne oksidacije alginata i njegove reduktivne aminacije u prisustvu tiramina, kao i rezultati fizičko hemijske karakterizacije dobijenih tiramin-alginata kao što su određivanje koncentracije fenolnih grupa spektrofotometrijski, određivanje koncentracije jonizabilnih grupa kiselo baznom titracijom i dokazivanje prisustva različitih funkcionalnih grupa u molekulu tiramin-alginata infracrvenim (FTIR) spektrima. U okviru ovog poglavlja opisani su i rezultati optimizacije metode imobilizacije peroksidaze u mikročesticama tiramin-alginatnih hidrogelova dobijenih enzimskom polimerizacijom u primarnim emulzijama vode u ulju. Dobijeni imobilizati peroksidaze u tiramin-alginatnim mikročesticama su okarakterisani u pogledu specifične aktivnosti, pH optimuma,  $K_m$  vrednosti, temperaturne stabilnosti, stabilnosti u 80 % (v/v) dioksanu i operativne stabilnosti u šaržnom reaktoru za oksidaciju pirogalola. **Četvrto poglavlje** je obuhvatilo rezultate optimizacije procesnih parametara za uklanjanje fenola iz sintetskih otpadnih voda. Za uklanjanje fenola su testirani najaktivniji imobilizati peroksidaze na makroporoznom glicidil-metakrilatu i u mikročesticama tiramin-alginata prethodno dobijeni pri optimizovanim uslovima imobilizacije. Prvo je testirana rastvorna peroksidaza za uklanjanje fenola pri čemu je optimizovana koncentracija vodonik-peroksida i njegovo dostavljanje u reakcioni sistem preko kuplovane reakcije glukoza oksidaze i glukoze. Koristeći optimalne uslove za dostavljanje vodonik-peroksida u reakcioni sistem i uz upotrebu imobilizovane peroksidaze prikazano je efikasno uklanjanje fenola u više reakcionih ciklusa upotrebe imobilizovanih sistema peroksidaze.

U poglavlju **Zaključna razmatranja** konsektivno su navedeni opšti zaključci prethodnih eksperimenata razvoja imobilisanih sistema peroksidaze i njihove primene u uklanjanju fenola iz vodenih rastvora. Zaključeno je da su razvijeni imobilizati peroksidaze na makroporoznom glicidil-metakrilatu i u mikročesticama tiramin-alginata koji su uz optimizovan postupak dostavljanja vodonik-peroksida u reakcioni sistem mogli biti upotrebljeni više puta za uklanjanje fenola od preko 70% što je predstavljalo poboljšanje u odnosu na prethodno opisane sisteme u literaturi.

### 3. OCENA DISERTACIJE

#### 3.1. Savremenost i originalnost

Sve veća primena enzima u hemijskoj industriji i zaštiti životne sredine i razvoj novih komercijalnih enzimskih procesa u svetu nedvosmisleno pokazuje da su enzimi biokatalizatori izuzetnih osobina i da u svetlu razvijanja novih tehnoloških postupaka baziranih na strogim principima vezanim za očuvanje životne sredine oni postaju nezamenljivi. Za ove procese su u razvijenim zemljama razvijeni različiti sistemi i postrojenja, veliki broj i do komercijalne primene. Na osnovu pregleda velikog broja radova i patenata u ovoj oblasti može se zaključiti da se enzimi, naročito oksidoreduktaze, danas uspešno koriste kao katalizatori u bioremedijaciji i prečišćavanju otpadnih voda.

Peroksidaza iz rena (EC 1.11.1.7) katalizuje oksidaciju različitih organskih jedinjenja uključujući fenole, alifatične i aromatične amine, leuko boje, askorbinsku kiselinu, neke aminokiseline, nitrite i veliki broj drugih jedinjenja, pa može da ima veliki praktični značaj u razgradnji aromatičnih jedinjenja prisutnih u nafti, uklanjanju fenola iz otpadnih voda, razgradnji lepkova i drugih adheziva. Osnovni problem za primenu ovih enzimskih procesa u prečišćavanju sintetičkih otpadnih voda je mala operativna stabilnost peroksidaza u prisustvu sopstvenih supstrata i na povišenim temperaturama, zbog čega se velika pažnja posvećuje imobilizaciji enzima na različitim nosačima u cilju stabilizacije i recikliranja.

Peroksidaza iz rena može u izvesnoj meri da polimerizuje fenole i druga aromatična jedinjenja i tako smanji njihovu koncentraciju u otpadnim vodama, međutim da bi se ovo postiglo, enzim mora biti dovoljno aktivan i stabilan u prisustvu velikog broja agresivnih hemijskih supstanci. Kako je u prethodnim radovima na imobilizaciji enzima pokazano da se oni mogu značajno stabilizovati

imobilizacijom, u ovom radu je ispitana mogućnost primene mikročestica kopolimera na bazi etilenglikol-dimetakrilata i glicidil-metakrilata kao nosača za efikasnu imobilizaciju peroksidaze iz rena. Ispitan je prvo uticaj na aktivnost i stabilnost biokatalizatora načina vezivanja, veličine čestica i poroznosti nosača, istraživanjima na dve serije polimernih mikročestica različite veličine (serija mikročestica kopolimera od 150 do 500  $\mu\text{m}$  i druga serija sa prečnikom od 2 do 2,5  $\mu\text{m}$ ). Utvrđeno je da se na manjim česticama dobija veći prinos imobilizacije, dok se najveća aktivnost i značajno povećanje termostabilnosti i stabilnosti u organskom rastvaraču postiže upotrebom nosača sa najvećom veličinom prečnika pora od 200 nm. Od metoda kovalentne imobilizacije najboljom se pokazala perjodatna metoda imobilizacije posebno u kombinaciji sa karbodiimidom na malim česticama polimera. U okviru ovih istraživanja optimizovana je po prvi put veličina prečnika pora i čestica makroporoznog glicidil-metakrilata za dobijanje imobilisane peroksidaze čija je stabilnost na 65°C kao i u 80% (v/v) dioksanu višestruko povećana (na osnovu vremena poluraspada,  $t_{1/2}$ ).

U literaturi je pokazano na primeru drugih enzima da se inkapsulacijom enzima u polimerne matrice koje su propustljive za supstrat i proizvode reakcije i ne propustljive za enzim može postići njegova značajna stabilizacija od negativnih uticaja iz spoljašnje sredine. Na osnovu literaturnog pregleda se može zaključiti, da su istraživanja vezana za inkapsulaciju peroksidaza u polimerne matrice alginatnog tipa nedovoljno zastupljena i uglavnom se zbog veličine pora u alginatnim hidrogelovima javlja spiranje enzima iz matrice, pa se zbog toga prave čestice alginata većih dijametara od po nekoliko milimetara što sve dovodi do smanjenje aktivnosti imobilizovane peroksidaze. U svrhu dodatne stabilizacije peroksidaze prilikom imobilizacije hemijskim vezivanjem za alginat, razvijeni su potpuno novi materijali alginatnog tipa uvođenjem fenolnih grupa u polisaharidni lanac. Peroksidaza je uspešno imobilizovana u mikročestice novih tiramin-alginata prečnika samo nekoliko desetina mikrometara uz zadržavanje enzima unutar mikročestica geliranjem usled umrežavanja prisutnih fenolnih grupa upravo peroksidazom koristeći kao reakcioni sistem primarne emulzije vodenih rastvora tiramin-alginata u ulju. Koristeći novodobijene tiramin-alginatne hidrogelove dobijeni su imobilizati peroksidaze čiji je poluživot na 70°C bio povećan 4 puta dok je poluživot u 80% (v/v) dioksanu bio povećan čak 22 puta. Izuzetno velika stabilizacija peroksidaze i njeno zadržavanje u alginatnim mikročesticama je bio posledica višestrukog kovalentnog vezivanja za fenolne grupe tiramin-alginata preko amino kiseline tirozina prisutnog u molekulu enzima peroksidaze.

Materijali dobijeni u ovoj disertaciji i razvijene metode imobilizacije peroksidaze koje daju veoma stabilne i aktivne imobilizate mogu biti od šireg značaja u oblasti biotehnologije i imobilizacije drugih enzimskih sistema.

### 3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U okviru doktorske disertacije citirano je 116 literaturnih navoda koji su omogućili da se prikaže stanje u ispitivanoj oblasti, kao i aktuelnost problematike. Savremena istraživanja objavljena u navedenim naučnim radovima su opisana, analizirana i prodiskutovana i izvedeni su zaključci koji su omogućili dobar uvid u oblasti primene imobilizovanih sistema peroksidaze u ovoj oblasti biotehnologije. Na osnovu ovog preseka stanja u literaturi izložene su osnovne smernice za istraživanja koja su izvršena u ovoj doktorskoj disertaciji. Iz obrazloženja predložene teme doktorske disertacije i objavljenih radova u prijavi, koju je kandidat podneo, kao i iz popisa literature koja je korišćena u istraživanju, uočava se adekvatno poznavanje predmetne oblasti istraživanja, kao i poznavanje aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu.

### 3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

Svi rezultati u okviru ove disertacije su dokazani odgovarajućim eksperimentima, kao i savremenim analitičkim instrumentalnim merenjima prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature.

Postupci hemijske sinteze makroporoznog glicidil-metakrilata u emulzionim sistemima su rađeni po publikovanim procedurama uz modifikacije postupka za dobijanje mikročestica manjih dijametara u opsegu od 2 do 2,5  $\mu\text{m}$ . Postupci sinteze novih materijala, tiramin-alginata, su rađeni novom kombinacijom već postojećih publikovanih postupaka oksidacije alginata perjodatom i reduktivnom aminacijom natrijum-cijanoborhidridom u prisustvu tiramina. Dobijeni materijali su okarakterisani standardnim metodama opisanim u literaturi kao što su FTIR, spektrofotometrija, kiselo bazna titracija, porozimetrija, svetlosna i elektronska mikroskopija.

Standardna aktivnost peroksidaze je određivana spektrofotometrijskom metodom pri čemu se koristio pirogalol kao supstrat. Sadržaj proteina je određivan spektrofotometrijskom metodom merenja apsorbanije na 280nm. Svi postupci hemijske modifikacije enzima, kao i imobilizacije enzima, su se izvodili prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature. U slučaju imobilizacije peroksidaze unutar tiramin-alginatnih mikro čestica primenjena je originalna metoda enzimske polimerizacije u primarnoj emulziji vode u ulju. Dobijeni imobilisani enzimi su okarakterisani prema standardnim metodama za određivanje termostabilnosti, stabilnosti u organskom rastvaraču i operative stabilnosti, pH i temperaturnog profila.

### 3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Na osnovu pregleda do sada objavljenih eksperimentalnih podataka i rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije ostvaren je značajan doprinos u modifikaciji materijala u cilju unapređene imobilizacije peroksidaze kao i samih metoda za imobilizaciju ovog enzima proizvedenih po sopstvenoj tehnologiji. U okviru teze optimizovani su uslovi za dobijanje preparata imobilizovane peroksidaze na makroporoznom glicidil-metakrilatu po sopstvenoj originalnoj proceduri sa velikom aktivnošću i stabilnosti u odnosu na prethodno opisane u literaturi. Dobijeni preparati imobilizovane peroksidaze su uspešno testirani u šaržnom reaktoru za uklanjanje fenola iz vodenih rastvora, što uz sopstvenu originalnu tehnologiju omogućuje njihovu nesmetanu primenu u industriji. Takođe su razvijeni novi derivati alginata koji omogućavaju proizvodnju hidrogelova enzimskim umrežavanjem preko fenolnih grupa. Tiramin-alginatni hidrogelovi su uspešno upotrebljeni za dobijanje preparata imobilizovane peroksidaze unutar mikročestica alginata sa veoma velikom stabilnošću u organskim rastvaračima. Novodobijeni hidrogelovi bi mogli da imaju veliku upotrebnu vrednost ne samo u biotehnologiji za imobilizaciju enzima nego i kao materijali za tkivni inženjering i kontrolisanu dostavu lekova.

### 3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

Kandidat Mr. Olivera Prodanović je diplomirani biolog i magistar multidisciplinarnih nauka (biofizika). Tokom izrade doktorske disertacije ispoljila je zaista izuzetnu stručnost u realizaciji eksperimenata i korišćenju različitih tehnika i metoda, a pri analizi rezultata je pokazala samostalnost, sistematičnost i kreativnost. Kandidat ima izuzetnu sklonost ka eksperimentalnom radu i stekla je bioinženjerski pristup u razvoju i realizaciji eksperimenatalnih tehnika. Na osnovu dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalni naučno-istraživački rad.

## **4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS**

### 4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Doprinos rezultata ove teze može se posmatrati sa sledećih stanovišta:

- U ovom radu ispitan je originalni postupak imobilizacije peroksidaze iz rena na makroporoznim glicidil-metakrilatima proizvedenim po sopstvenoj tehnologiji. Optimizovan je postupak imobilizacije u pogledu veličine prečnika pora korišćenog makroporoznog polimera, metode imobilizacije i količine dodatog enzima tokom imobilizacije. Dobijeni rezultati i imobilizat peroksidaze sa značajno povećanom termostabilnošću i stabilnošću u organskom rastvaraču predstavljaju značajan doprinos u pogledu razvoja tehnika imobilizacije i otvaraju nove mogućnosti primene peroksidaza u polimerizacionim reakcijama uklanjanja fenola iz vodenih rastvora i sinteze polimera u organskim rastvaračima.

- Testiran je uticaj veličine čestica makroporoznog glicidil-metakrilata za različite veličine prečnika pora na aktivnost imobilizata i prinos imobilizacije. Ovaj uticaj je ispitan za četiri različite metode imobilizacije kao i za različite količine dodatog enzima tokom imobilizacije. Utvrđeno je da se upotrebom čestica manjeg prečnika dobija veći prinos imobilizacije i da se opet najstabilniji preparati imobilizovane peroksidaze dobijaju za najveću veličinu prečnika pora od 200nm. Novodobijeni materijali za imobilizaciju peroksidaze sa veličinom čestica od 2  $\mu\text{m}$  bi mogli imati značajan naučni doprinos u razvoju novih materijala za imobilizaciju drugih enzima kao i materijala za hromatografiju.

- U ovom radu su razvijeni novi materijali sa poboljšanim svojstvima za imobilizaciju enzima zasnovani na prirodnom polisaharidu alginatu. Kombinacijom poznatih metoda hemijske modifikacije alginata kao što su perjodatna oksidacija i reduktivna aminacija natrijum-cijanoborhidridom u prisustvu tiramina dobijeni su tiramin-alginati različitih stepena modifikacije. Novodobijeni materijali su uspešno upotrebljeni za proizvodnju hidrogelova enzimskim umrežavanjem preko fenolnih grupa. Koristeći primarne emulzije vode u ulju za polimerizaciju tiramin alginata peroksidazom uspešno su dobijeni preparati imobilizovane peroksidaze unutar mikročestica hidrogelova prečnika samo nekoliko desetina mikrometara. Preparati imobilizovane peroksidaze dobijeni ovom metodom su pokazali izuzetnu termostabilnost i stabilnost u organskom rastvaraču uz povećanje vremena polureakcije od preko 22 puta.

- Optimizovana je reakcija polimerizacije fenola u vodenim rastvorima rastvornom peroksidazom korišćenjem kuplovanog enzimskog sistema sa glukozom oksidazom i glukozom za dostavu vodonik-peroksida u reakcioni sistem, što je dovelo do smanjenja inaktivacije peroksidaze peroksidom. Koristeći optimizovan postupak dostave vodonik-peroksida uspešno su testirani preparati peroksidaze imobilizovane na makroporoznom glicidil-metakrilatu i unutar tiramin-alginatnih mikročestica u reakciji polimerizacije fenola u vodenim rastvorima. Imobilizacijom peroksidaze omogućena je višekratna upotreba enzima, dok je optimizacijom dostave vodonik-peroksida obezbeđeno minimalno smanjenje aktivnosti enzima tokom reakcije.

#### 4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Definisanjem ciljeva istraživanja utvrđena je metodologija istraživanja primenjena tokom izrade doktorske disertacije. Uvidom u dostupnu literaturu iz ove oblasti istraživanja koja razmatra imobilizaciju i hemijsku modifikaciju peroksidaze i bioreaktore za procese sa imobilisanim biokatalizatorima, kao i razmatranjem rezultata istraživanja dobijenih primenom odabrane metodologije u okviru ove disertacije, može se primetiti da se dobijeni rezultati nadovezuju, ali i značajno dopunjuju postojeće rezultate. Na taj način, ova doktorska disertacija predstavlja važan korak ka praktičnoj primeni imobilisane peroksidaze u biotehnologiji ali i otvara nove mogućnosti za dalja istraživanja novih nosača posebno onih zasnovanih na modifikovanim alginatima i makroporoznim glicidil-metakrilatima, kao i postupaka imobilizacije ovog ali i drugih enzima.

#### 4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Kandidat Mr. Olivera Prodanović je rezultate svog istraživanja tokom izrade ove disertacije potvrdila objavljivanjem radova u časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja i saopštavanjem radova na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Rezultati dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada kandidata u ovoj oblasti prikazani su u 7 (sedam) radova objavljenih u naučnim časopisima međunarodnog značaja (oznaka grupe M20: vrsta rezultata M21-2 rada; M22-1 rad; M23-4 rada), 3 (tri) rada objavljenih u zbornicima skupova međunarodnog značaja štampana u celini (oznaka grupe M30: vrsta rezultata M33, 3 rada), 3 (tri) rada objavljenih u zbornicima skupova nacionalnog značaja (oznaka grupe M60: vrsta rezultata M63, 3 rada).

#### Kategorija M21:

1. **Prodanovic O.**, Spasojevic D., Prokopijevic M., Radotic K., Markovic N., Blazic M., Prodanovic R., Tyramine modified alginates via periodate oxidation for peroxidase induced hydrogel formation and immobilization, *Reactive and Functional Polymers*, 93: 77-83 (2015). ISSN 1381-5148, IF(2013) 2,822; 13/71 Chemistry, Applied.
2. Prokopijevic M., **Prodanovic O.**, Spasojevic D., Stojanovic Z., Radotic K., Prodanovic R., Soybean hull peroxidase immobilization on macroporous glycidyl methacrylates with different surface characteristics, *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 37(5): 799-804 (2014). ISSN 1615-7591, IF(2012) 1,869; 38/133 Engineering, Chemical.

#### Kategorija M22:

1. **Prodanović O.**, Prokopijević M., Spasojević D., Stojanović Ž., Radotić K., Knežević-Jugović Z., Prodanović R. (2012) Improved covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate-based copolymers, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **168** (5): 1288-1301. ISSN 0273-2289, IF(2010) 1,879, 79/160 Biotechnology & Applied Microbiology.

#### Kategorija M23:

1. Spasojević D., Prokopijević M., **Prodanović O.**, Pirtea M.G., Radotić K., Prodanović R., Immobilization of chemically modified horse radish peroxidase within activated alginate beads, *Hemijska Industrija*, 68(1): 117-122 (2014). ISSN 0367-598X, IF(2014) 0,364. 121/135 Engineering, Chemical.
2. Pristov Bogdanovic J., Mutavdzic D., **Prodanovic O.**, Maksimovic V., Radotić K., Relations of cell wall bound peroxidases, phenols and lignin in needles of Serbian spruce *Picea Omorika* (Pančić) Purkyne in the natural habitat, *Biochemical Systematics and Ecology*, **59**: 271-277 (2015). ISSN 0305-1978; IF(2014) 0,967; 260/290 Biochemistry & Molecular Biology.
3. **Prodanovic O.**, Prodanovic R., Bogdanovic Pristov J., Mitrovic A., Radotic K., Effect of cadmium stress on antioxidative enzymes during germination of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně], *African Journal of Biotechnology*, **11**(52): 11377-11385 (2012). ISSN 1684-5315; IF(2010) 0,573; 137/160 Biotechnology & Applied Microbiology.



4. Blazic M., Kovacevic G., **Prodanovic O.**, Ostafe R., Gavrovic Jankulovic M., Fischer R., Prodanovic R., Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases, *Protein Purification and Expression*, 89(2):175-180 (2013). ISSN 1046-5928; IF(2014) 1,695, 99/163 Biotechnology & Applied Microbiology.

#### Kategorija M33:

1. **Prodanović, O.**, Prokopijević, M., Spasojević, D., Prodanović, R., Stojanović, Ž., Radotić Hadži-Manić, K.: "Immobilization of horse radish peroxidase on different macroporous glycidyl methacrylates for wastewater treatment", Zbornik referata, rezimea referata i poster prezentacija sa Naučnog kongresa: Zaštita prirode u XXI vijeku, Žabljak 2011, Crna Gora, Knjiga BR2, str. 709-711.
2. Spasojević, D., Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Radotić Hadži-Manić, K., Prodanović, R.: "Poređenje dve metode za imobilizaciju HRP u alginatu za prečišćavanje otpadnih voda", Zbornik referata, rezimea referata i poster prezentacija sa Naučnog kongresa: *Zaštita prirode u XXI vijeku*, Žabljak 2011, Crna Gora, Knjiga BR2, str. 653-656.
3. Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Spasojević, D., Prodanović, R., Stojanović, Ž., Radotić Hadži-Manić, K.: "Optimizacija uslova za glutaraldehidnu imobilizaciju peroksidaze iz soje", Zbornik referata, rezimea referata i poster prezentacija sa Naučnog kongresa: *Zaštita prirode u XXI vijeku*, Žabljak 2011, Crna Gora, Knjiga BR2, str. 697-700.

#### Kategorija M 63:

1. **Prodanović, O.**, Prokopijević, M., Spasojević, D., Stojanović, Ž., Radotić, K., Knežević-Jugović, Z., Prodanović, R.: "Covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate based copolymer", Knjiga radova sa 50. Jubilarnog Savetovanja Srpskog Hemijskog Društva, Beograd 2012, ISBN: 978-86-7132-049-8, str. 195-198.
2. Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Spasojević, D., Stojanović, Ž., Radotić Hadži-Manić, K., Prodanović, R.: "Poređenje imobilizacije peroksidaze soje na različite glicidil metakrilat polimere", Knjiga radova sa 50. Jubilarnog Savetovanja Srpskog Hemijskog Društva, Beograd 2012, ISBN: 978-86-7132-049-8, str. 191-194.
3. Spasojević, D., Prokopijević, M., **Prodanović, O.**, Radotić Hadži-Manić, K., Prodanović, R.: "Poređenje četiri metode za imobilizaciju HRP u alginatu radi potencijalne primene u prečišćavanju otpadnih voda", Knjiga radova sa 50. Jubilarnog Savetovanja Srpskog Hemijskog Društva, Beograd 2012, ISBN: 978-86-7132-049-8, str. 199-202.

## 5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Na osnovu prethodno iznetih razmatranja rezultata doktorske disertacije Mr. Olivera Prodanović, pod nazivom „Razvoj imobilisanih sistema peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*) za polimerizacione reakcije i uklanjanje fenola iz otpadnih voda” smatramo da su ispunjeni svi ciljevi i zadaci rada na ovoj tezi i da ona svojim sadržajem i kvalitetom značajno doprinosi oblasti Hemija i hemijska tehnologija, što je i potvrđeno objavljivanjem radova u međunarodnim časopisima, kao i publikovanjem rezultata na međunarodnim i nacionalnim konferencijama. Takođe, komisija je mišljenja da je kandidat ispoljio izuzetnu naučno-istraživačku sposobnost u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta da se doktorska disertacija pod nazivom „Razvoj imobilisanih sistema peroksidaze iz rena (*Armoracia rusticana*) za polimerizacione reakcije i uklanjanje fenola iz otpadnih voda” kandidata Mr. Olivere Prodanović prihvati, izloži na uvid javnosti i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu. Takođe, da se nakon završetka ove procedure, kandidat pozove na usmenu odbranu doktorske disertacije pred Komisijom u istom sastavu

## ČLANOVI KOMISIJE

.....  
Prof. dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....  
Prof. dr Dušan Mijin, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....  
Prof. dr Dejan Bezbradica, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....  
dr Ksenija Radotić, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja