

## **Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet**

### **Nastavno-naučno veće**

**Predmet:** Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Marinele Šokarda Slavić, master-diplomirani biohemičar

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 14.07.2016. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Marinele Šokarda Slavić, prijavljene pod naslovom:

**„Karakterizacija, racionalni dizajn i primena visokoefikasne  $\alpha$ -amilaze iz *Bacillus licheniformis* za hidrolizu sirovog skroba“**

Nakon pregleda doktorske disertacije, podnosimo Veću sledeći

## **IZVEŠTAJ**

### **A. Prikaz sadržaja disertacije**

Doktorska disertacija Marinele Šokarda Slavić pod navedenim naslovom napisana je na 125 strana A4 formata (prored 1,5), sadrži 25 slika i 14 tabela. Rad obuhvata sledeća poglavlja: Uvod, Opšti deo, Naši radovi, Eksperimentalni deo i Literatura. Pored navedenog, disertacija sadrži izvod na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj, zahvalnicu i biografiju kandidata sa bibliografijom.

U **Uvodu** je dat kraći osvrt na oblast istraživanja i aktuelnost teme rada. Kako je skrob važan sastojak hrane i supstrat za proizvodnju mnogih industrijskih proizvoda kao što su glukozni, fruktozni i maltozni sirupa ili bioetanol istraživanja u ovoj oblasti su uvek aktuelna, a poslednjih godina velikim probojem u industriji obrade skroba smatra se mogućnost enzimске hidrolize granularnog (nerastvornog, sirovog) skroba zbog mogućnosti smanjenja ukupnih troškova, uštede u energiji i efikasnog iskorišćavanja bioresursa. Imajući to u vidu kao ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije postavljeni su razvoj efikasnog i reproduktivnog procesa za dobijanje velike količine rekombinantnog proteina kroz dizajn medijuma za rast mikroorganizma, optimizaciju koraka u proizvodnji  $\alpha$ -amilaza iz *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*) i izbor pogodnih tehnika fermentacije. Planirana je

višestruka primena dizajna eksperimenta i to u optimizaciji industrijskog aspekta procesa hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba, optimizaciji novog postupka simultane hidrolize i saharifikacije skroba za dobijanje bioetanola i u optimizaciji efikasne metode za prečišćavanje rekombinantne  $\alpha$ -amilaze *BliAmy* direktno iz fermentacione tečnosti u minimalnom broju koraka. U cilju doprinosa novim saznanjima o strukturnim karakteristikama enzima značajnih za adsorpciju i hidrolizu sirovog skroba planiran je i racionalni dizajn *BliAmy*.

U **Opštem delu** kandidat opisujeativne (sirove) skrobne granule, njihovu građu i podložnost hidrolizi. Kandidat je opisao enzime koji razgrađuju skrob *in vitro*, ali su izdvojene i detaljno opisane posebno  $\alpha$ -amilaze koje hidrolizuju sirovi skrob - RSDA (od eng. raw starch degrading  $\alpha$ -amylases). Detaljno je objašnjena klasifikacija, mehanizam dejstva, organizacija strukturnih domena i funkcionalno značajnih aminokiselinskih ostataka  $\alpha$ -amilaza. Takođe dat je pregled literature u kojem je opisano dobijanje nativnih i rekombinantnih RSDA, kao i industrijski i prehrambeni aspekti primene RSDA u hidrolizi sirovog skroba. U ovom poglavlju su opisani i principi dizajna eksperimenta kroz objašnjenje faktorijalnog dizajna, kvadratnih modela: centralnog kompozitnog dizajna i Box-Behenkenovog dizajna, kao i statistička analiza modela i primena u eksperimentalnom radu. U ovom poglavlju je opisana i proizvodnja bioetanola, tečnog biogoriva jednog od najznačajnijih alternativnih rešanja za zamenu fosilnih goriva, sa posebnim akcentom na proizvodnju bioetanola iz sirovog skroba.

Poglavlje **Naši radovi** se sastoji od devet celina u okviru kojih kandidat predstavlja rezultate i diskusiju svojih istraživanja. U prve dve celine kandidat opisuje produkciju rekombinantne  $\alpha$ -amilaze *BliAmy* u biorektoru i načine prečišćavanja dobijenog proteina. U trećoj i četvrtoj celini je opisana statistička optimizacija hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba korišćenjem rekombinantne  $\alpha$ -amilaze *BliAmy*. kao i poređenje sa komercijalnom  $\alpha$ -amilazom. U petoj i šestoj celini prikazana je analiza rastvorljivih oligosaharida proizvedenih u hidrolizi sirovog kukuruznog skroba korišćenjem *BliAmy* kao i analiza rezidualnog skroba zaostalog nakon toga. U sedmoj celini je opisan dizajn eksperimenta za optimizaciju prečišćavanja *BliAmy* na mešovitoj hidrofobno-jonoizmenjivačkom matriksu Nuvia cPrime<sup>TM</sup>. Osmo celina govori o rezultatima dobijenih racionalnim dizajnom aminokiselinskih ostataka *BliAmy* potencijalno važnih u vezivanju za skrob van aktivnog mesta - SBS (od eng. surface binding sites). U ovim rezultatima je prikazana identifikacija mogućih SBS kod *BliAmy* bioinformatički i skraćivanjem gena

(*truncation*), kao i karakterizacija dobijenih mutantnih varijanti *BliAmy* ispitivanjem kinetike adsorpcije i hidrolize rastvornog i sirovog skroba. Na kraju je izdvojena i posebno opisana kristalografska identifikacija mogućih SBS kod *BliAmy* kao i karakterizacija mutantnih varijanti *BliAmy* F257A i Y358A. Poslednja, deveta celina detaljno opisuje primenu dizajna eksperimenta u optimizaciji novog procesa simultane hidrolize i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba za proizvodnju bioetanola. Na kraju poglavlja u delu Zaključci sumirani su rezultati dobijeni u okviru doktorske disertacije.

U okviru poglavlja **Eksperimentalni deo** kandidatkinja je dala detaljan opis reagenasa i eksperimentalnih procedura korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji. Poglavlja iz eksperimentalnog dela prate poglavlja data u **Našim radovima**.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata**

Rekombinantna  $\alpha$ -amilaza iz *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*), efikasna u hidrolizi granularnog skroba ispod temperature geliranja, proizvedena je ekstracelularno korišćenjem *Escherichia coli* kao domaćina. U ovoj disertaciji su razvijeni efikasni i reproduktivni procesi fermentacije sa ćelijama *E. coli* BL21 (DE3) i *E. coli* C43 (DE3) kroz dizajn medijuma za rast mikroorganizma i optimizaciju koraka u proizvodnji amilaze. Dobijene su velike količine *BliAmy* i to, u fermentaciji sa ćelijama *E. coli* BL21 (DE3) ukupna amilazna aktivnost od  $250,5 \text{ IU mL}^{-1}$  ( $0,7 \text{ g L}^{-1}$ ), a sa ćelijama *E. coli* C43 (DE3)  $500 \text{ IU mL}^{-1}$  ( $1,2 \text{ g L}^{-1}$ ).

Korišćenjem statističke metode odgovornih površina optimizovan je proces hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba. Može se zaključiti da je *BliAmy* veoma efikasna jer je hidrolizovala 91 % prilikom hidrolize 30 % - ne suspenzije skroba nakon 24 sata. Analiza rastvorljivih oligosaharida proizvedenih u hidrolizi 30% suspenzije skroba sa *BliAmy* tankoslojnom hromatografijom je pokazala da je raspodela slična uobičajnoj distribuciji oligosaharida koja se dobija u hidrolizi sirovog skroba klasičnim otečnjavajućim  $\alpha$ -amilazama.

Na osnovu promena u kristalnoj strukturi analiziranjem rezidualnog skroba koji zaostaje nakon hidrolize 30%-ne suspenzije nakon 5 i 24 sata pokazano je da kukuruzni skrob ima A-tip i Vh-tip kristaliniteta. Upoređivanjem difrakcionih intenziteta pikova kristalne strukture nativnog i rezidualnog skroba nakon oba testirana vremena hidrolize može se zaključiti da nema povećanja kristaliniteta u rezidualnom skrobu. Ovo ukazuje na to da

*BliAmy* najverovatnije istom brzinom hidrolizuje i kristalne i amorfne regione u granulama skroba, što je u skladu sa načinom hidrolize skrobnih granula tzv. „granula po granula“. Skenirajućom elektronskom mikrografijom je pokazano da pri hidrolizi kukuruznih skrobnih granula unutar istog eksperimenta nisu sve granule podjednako podložne enzimskoj hidrolizi, što je verovatno posledica načina na koji se amilaza adsorbuje na granule skroba. Hidroliza se odvija na način „granula po granula“ pri čemu se granula kompletno hidrolizuje.

Primenom mešovito g matriksa Nuvia cPrime™ razvijena je efikasna metoda za prečišćavanje rekombinantne *BliAmy* uz istovremeno koncentrovanje, uklanjanje pigmenata i prečišćavanje direktno iz fermentacione tečnosti u jednom koraku. Optimalni uslovi prečišćavanja na Nuvia cPrime™ za maksimalni prinos specifične aktivnosti *BliAmy* od 96% su: pH vezivanja 5,3 + 150 mM NaCl i pH eluiranja 8,0 + 500 mM NaCl.

Određena je kristalna struktura *BliAmy* koja pokazuje da se enzim sastoji iz tri domena: N-terminalni katalitički domen A, domen B i C-terminalni domen. Kristalografskom analizom strukture *BliAmy* u kompleksu sa supstratima i inhibitorima identifikovano je SBS mesto koje je značajno za adsorpciju na skrobne granule, kao i hidrolizu što je potvrđeno eksperimentima adsorpcije i hidrolize rastvornog i sirovog skroba nakon što su racionalnim dizajnom dobijani mutanti, F257A i Y356A.

Optimizovan simultani proces hidrolize i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba sa *BliAmy*-Dextrozyme GA i alkoholne fermentacije za proizvodnju bioetanola u trajanju od samo 36 časova, pokazao se kao veoma efikasan proces dobijanjem 86% teorijskog prinosa etanola.

U ovoj disertaciji je prikazana osnovna prednost primene eksperimentalnog dizajna u mogućnosti organizovanog pristupa rešavanju nekog definisanog problema, nezavisno od stepena njegove složenosti. Eksperimentalnim dizajnom je kroz optimizaciju hidrolize skroba, prečišćavanje proteina i dobijanje bioetanola, omogućena istovremena procena većeg broja faktora, kao i prepoznavanje njihovog značaja i međusobnih interakcija. Na taj način se dobijaju korisnije i preciznije informacije o analiziranom sistemu usled istovremene procene uticaja većeg broja faktora, značajno smanjujući broj eksperimenata.

### **C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature**

Kako se u industriji prerade skroba obično koriste suspenzije koje sadrže oko 25—33% suve mase skroba, neophodno je pronaći amilaze efikasne u hidrolizi ovako koncentrovanih suspenzija. Postoji veoma malo objavljenih radova o amilazama koje imaju

sposobnost da efikasno hidrolizuju koncentrovane suspenzije sirovog skroba, kako zbog inhibitornih efekata supstrata ili proizvoda na aktivnost enzima, tako i zbog potrebe za primenom većih doza enzima.

Problemi koje bi trebalo rešiti pre nego što bi RSDA mogla da postane enzim izbora za industrijsku primenu su nizak prinos i visoka cena proizvodnje. Ovi problemi se značajno prevazilaze poslednjih nekoliko godina razvojem novih sojeva, pametnim dizajnanjem podloga za rast i optimizacijom koraka proizvodnje, kao i izborom odgovarajućih fermentacionih tehnika i tehnika za prečišćavanje proteina. Ekstracelularna proizvodnja rekombinantnih proteina ima značajne prednosti naspram intracelularne proizvodnje, a efikasna ekstracelularna produkcija u *E. coli* je danas moguća zbog primene različitih strategija sa različitim sekvencijama signalnih peptida. Na sličan način je proizvedena i ekstracelularna rekombinantna *BliAmy*. Novi pristup zasnovan je na fuziji rekombinantnog prekursora za signalni peptid DsbA i usmeravanje na kotranslacioni SRP (eng. signal recognition-particle) zavisni put, pri čemu je ostvarena sekrecija potpuno aktivnog enzima. Postupkom semikontinualne („fed-batch”) fermentacije, uz dvostepeno dodavanje supstrata postignuta je ukupna amilazna aktivnost koja je 7 puta viša nego u šaržnoj fermentaciji, a dobijene količine iznad ranga su u poređenju sa drugim literaturnim enzimima proizvedenim ekstracelularno u *E. coli*.

*Dizajn eksperimenta je uspešno* primenjen za optimizaciju hidrolize visoko koncentrovane suspenzije sirovog skroba kao ekonomičan način dobijanja maksimalne količine informacija u kratkom vremenskom periodu i sa što je manje eksperimenata moguće. Dizajn eksperimenta primenjen u ovoj disertaciji kao takav prvi put je opisan u literaturi u kojoj se mogu pronaći podaci vezani sa rastvorni skrob. *BliAmy* može u potpunosti da hidrolizuje sirovi kukuruzni skrob nakon produženog vremena inkubacije, za razliku od drugih visokoefikasnih bakterijskih RSDA. Mali broj radova u literaturi opisuje bakterijske  $\alpha$ -amilaze koje mogu da hidrolizuju sirovi skrob pri visokim koncentracijama, od kojih nijedna nije  $\alpha$ -amilaza iz *B. licheniformis*. *BliAmy* se pokazala efikasnijom od mnogih u literaturi prikazanih  $\alpha$ -amilaza, kao i od komercijalne *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaze Termamyl® 120 L.

Uprkos tome što postoje brojne i detaljne studije o strukturi, termalnim osobinama, molekulskom mehanizmu i ireverzibilnoj termoinaktivaciji amilaze iz *B. licheniformis* veoma malo literaturnih podataka postoji o enzimskoj karakterizaciji. Podaci o arhitekturi mesta vezivanja šećera u aktivnom mestu su retki, a studije o kinetici i načinu delovanja ovog industrijski važnog enzima praktično se ne mogu naći u literaturi naročito kada se sirovi

škrob koristi kao supstrat. Takođe ne postoje podaci o mogućim SBS mestima. Za takve mehanističke i kristalografske studije neophodna je dovoljna količina veoma čistog enzima za šta je veoma značajno unaprediti prečišćavanje proteina. U ovoj disertaciji to je postignuto upotrebom mešovitog matriksa za hromatografiju. Ovaj način prečišćavanja nije zamena za tag tehnologiju prečišćavanja rekombinantnih proteina, iako i u odnosu na nju može imati neke prednosti, ako se ima u vidu da postoje mnogi primeri proteina u kojima N- ili C-terminus nije izložen rastvaraču, te je u tom slučaju dodatak taga nesvrshodan, ili ako je protein potreban za kristalografske studije u kojim je poželjno imati protein bez taga.

Fizička adsorpcija amilaza na škrobnim granuloma koja je omogućena prisustvom *domena koji se vezuju za škrob - SBD (eng. Starch binding domen) ili SBS* na površini enzima često se smatra preduslovom za mogućnost hidrolize sirovog skroba. Kako svega oko 10% amilolitičkih enzima sadrži SBD domen u svojoj strukturi a i pregledom efikasnosti enzima iz literature evidentno je da i  $\alpha$ -amilaze bez SBD, kao što je *BliAmy* mogu biti podjednako ako ne i efikasnije u hidrolizi sirovog skroba postaje jasno da prisustvo SBD nije glavni zahtev za degradaciju škrobnih granula. U ovoj disertaciji kristalografskom analizom strukture *BliAmy* u kompleksu sa supstratima i inhibitorima identifikovano prvi put je detektovano SBS u amilazi poreklom iz *B. licheniformis*. SBS mesto je značajno za adsorpciju na škrobne granule kao i hidrolizu što je potvrđeno eksperimentima adsorpcije i hidrolize rastvornog i sirovog skroba nakon što su racionalnim dizajnom dobijani mutanti, F257A i Y356A. F257 nije kao takva poznata u literaturi, dok je Y363 koji odgovara Y358 kod *BliAmy* detektovan u SBS mestu  $\alpha$ -amilaze *Bacillus* sp. 707. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je uloga SBS na površini *BliAmy* najverovatnije u usmeravanju lanca oligosaharida skroba ka aktivnom mestu i ona je veoma bitna za katalitičku aktivnost enzima. Daljim eksperimentima upotpuniće se slika o mogućnostima dalje manipulacije ovim aminokiselinama u cilju dobijanja efikasnijeg biokatalizatora.

Iako postoji veliki broj literaturnih podataka o optimizaciji *hidrolize sirovog skroba do bioetanola*, oni su dosta različiti u zavisnosti od toga koji proces se primenjuje. Cilj optimizacije primenjene u ovoj disertaciji bio je dobijanje bioetanola brzo i jednostavno i u tom smislu definisano je da traje dva radna dana (oko 36 sati) i u kojem bi se radio simultan proces hidrolize i saharifikacije skroba, a da se zatim samo smanji temperatura pre dodatka kvasca čime bi se proces pojednostavio. Proces je optimizovan dizajnom eksperimenta i primenom optimalnih koncentracija enzima postižu se visoke vrednosti prinosa glukoze iz skroba tokom hidrolize. Poređenja radi, hladnom hidrolizom kukuruznog brašna, upotrebom komercijalog STARGEN 001<sup>TM</sup> koji sadrži  $\alpha$ -amilazu iz *Aspergillus kawachi* i glukoamilazu

iz *Aspergillus niger* dobijeno je 84,6% od teorijskog prinosa etanola nakon 72 sata dok je hidrolizom kukurznog brašna enzimskim ekstraktom poreklom iz *A. niger* i *A. awamori* nakon 72 sata hidrolize na 32°C dobijen etanol 89,6% od teorijskog prinosa.

## D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

### 1. Radovi saopšteni u međunarodnim časopisima:

M21a:

1. Nikola Lončar, Marinela Šokarda Slavić, Zoran Vujčić, Nataša Božić. Mixed-mode resins: taking shortcut in downstream processing of raw-starch digesting  $\alpha$ -amylases. *Sci Rep* (2015) 5, 15772.

M21:

2. Marinela Šokarda Slavić, Milja Pešić, Zoran Vujčić, Nataša Božić. Overcoming hydrolysis of raw corn starch under industrial conditions with *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a  $\alpha$ -amylase. *Appl Microbiol Biotechnol* (2016) 2709-2719.

Novi časopis još uvek nekategorisan:

3. Nataša Božić, Nikola Lončar, Marinela Šokarda Slavić, Zoran Vujčić. Raw starch degrading  $\alpha$ -amylases: an unsolved riddle. *Amylase* (2017) 1: 12–25. Revijalni rad.

### 2. Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M 34):

1. Marinela Šokarda Slavić, Zoran Vujčić, Nataša Božić. Hydrolysis of concentrated raw corn starch with *Bacillus licheniformis* 9945a  $\alpha$ -amylase. Molecules of life-FEBS3+ meeting, Portorož, Slovenia (2015) Poster PI-56, pp.178.
2. Marinela Šokarda Slavić, Zoran Vujčić, Nataša Božić (2016) Hydrolysis of concentrated raw corn starch suspension with *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a  $\alpha$ -amylase. 6th symposium on the alpha-amylase family, Sep 11-15, Smolenice, Slovakia, P03, p. 59.
3. Marinela Šokarda Slavić, Nikola Lončar, Štefan Janeček, Zoran Vujčić, Nataša Božić (2016) Identification of possible surface binding sites (SBSs) in raw starch degrading *Bacillus licheniformis* 9945a  $\alpha$ -amylase. 6th symposium on the alpha-amylase family, Sep 11-15, Smolenice, Slovakia, P02, p. 58.

4. Nikola Lončar, Marinela Šokarda Slavić, Zoran Vujčić, Nataša Božić (2016) One-step downstream processing of raw-starch digesting  $\alpha$ -amylase with mixed-mode resin. 8<sup>th</sup> International congress on biocatalysis, August 28- September 1, Hamburg University of technology, Germany, P4-13, p.68.
5. Nataša Božić, Marinela Šokarda Slavić, Henriëtte Rozeboom, Nikola Lončar, Dick Janssen, Zoran Vujčić (2017) Identification of Surface Binding Sites (SBSs) in raw starch degrading *Bacillus licheniformis* 9945a  $\alpha$ -amylase, 12<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting, April 23-26, BOKU Vienna, P064, p 165.
6. Marinela Šokarda Slavić, Henriëtte Rozeboom, Nikola Lončar, Dick Janssen, Zoran Vujčić, Nataša Božić (2017) Identification of Surface Binding Sites (SBSs) in raw starch degrading *Bacillus licheniformis* 9945a  $\alpha$ -amylase, 19<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, EUROCARB, July 2-6, Barcelona.

### **3. Radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u izvodu (M 64)**

1. Marinela Šokarda Slavić, Zoran Vujčić, Nataša Božić. Hidroliza koncentrovane suspenzije sirovog skroba  $\alpha$ -amilazom iz *Bacillus licheniformis* 9945a. 52. Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, Novi Sad, Serbia (2015), Oral Presentation-BT O1, pp 98.
2. Marinela Šokarda Slavić, Zoran Vujčić, Nataša Božić. Prevazilaženje industrijskih ograničenja hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba. Treća konferencija mladih hemičara Srbije, Belgrade, Serbia (2015), Poster Presentation-BB P 01, pp 60
3. Marinela Šokarda Slavić, Nikola Lončar, Nataša Božić, Zoran Vujčić. Mixed-mode resins: taking shortcut in downstream processing of raw-starch digesting  $\alpha$ -amylase. "Integrated research in life science" Serbian Biochemical Society Fifth Conference, Belgrade, Serbia (2015) Poster-P12, pp 137
4. Marinela Šokarda Slavić, Nataša Božić, Zoran Vujčić. Temperatura gajenja različitih domaćih izolata *Bacillus* sp. na čvrstoj podlozi utiče na različitu produkciju amilaza koje hidrolizuju sirovi skrob. IX kongres mikrobiologa Srbije-Mikromed 2013, Beograd, Srbija (2013) Poster-P8.



## E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji pod naslovom „Karakterizacija, racionalni dizajn i primena visokoefikasne  $\alpha$ -amilaze iz *Bacillus licheniformis* za hidrolizu sirovog skroba“ kandidat, Marinela Šokarda Slavić, uspešno odgovorila na sve postavljene zadatke i ciljeve koji se tiču karakterizacije, racionalnog dizajna i primene  $\alpha$ -amilaze iz *Bacillus licheniformis*. Kandidatkinja je razvila efikasan i reproduktivan proces za dobijanje velike količine rekombinantnog proteina kroz dizajn medijuma za rast mikroorganizma, optimizaciju koraka u proizvodnji  $\alpha$ -amilaze i izbor pogodnih tehnika fermentacije što je preduslov industrijske primene biotehnološkog proizvoda. Zatim je upotrebom produkovanog rekombinantnog enzima optimizovala industrijski aspekt procesa hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba statističkom metodom odgovornih površina. Uspešno je optimizovala i novi postupak simultane hidrolize i saharifikacije skroba upotrebom produkovanog rekombinantnog enzima i komercijalne glukoamilaze za dobijanje bioetanola. Konačno, razvila je efikasnu metodu za prečišćavanje produkovanog rekombinantnog enzima uz istovremeno koncentrovanje, uklanjanje pigmenata i prečišćavanje direktno iz fermentacione tečnosti u jednom koraku, u cilju dobijanja što većeg prinosa proteina neophodnog za kinetičke, mehanističke i kristalografske analize, čime je omogućena identifikacija SBS mesta značajnog za adsorpciju i hidrolizu skrobnih granula, što je naknadno potvrđeno i racionalnim dizajnom kritičnih aminokiselinskih ostataka na enzimu. Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u okviru tri rada od kojih je jedan štampan u vrhunskom međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (kategorije M-21a), jedan štampan u vrhunskom međunarodnom časopisu (M-21), a revijalni rad u novom časopisu koji još uvek nije kategorisan i saopšteni na 6 međunarodno značajnih skupova i 4 skupa nacionalnog značaja. Ostatak rezultata biće publikovan u još dva rada. Komisija smatra da rezultati objavljeni u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos u optimizaciji dobijanja, karakterizaciji i primeni rekombinantnog enzima *BliAmy*. Istovremeno Komisija smatra da se ova disertacija uklapa u savremene trendove biohemije i biotehnologije dajući značajan doprinos u karakterizaciji i primeni enzima koji hidrolizuju sirovi skrob.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Marinele Šokarda Slavić prihvati i odobri njenu odbranu.

**Beograd,**

**Komisija**

**13.06.2017**

---

dr Zoran Vujčić, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentor

---

dr Nataša Božić, naučni savetnik Centra za hemiju IHTM, Univerziteta u Beogradu, mentor

---

dr Marija Gavrović - Jankulović, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, član