

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Наташе Шекуљице, маг. инж. технологије.

Одлуком 35/180 бр. од 14.04.2016. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Наташе Ж. Шекуљице под насловом

Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода

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

29.04.2015. - Кандидат Наташа Ж. Шекуљица, маг. инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: "Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода" а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме.

17.09.2015. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, на основу поднетог извештаја Комисије, донета је Одлука о прихватању предлога теме докторске дисертације Наташе Ж. Шекуљице, маг. инж. технологије, под називом "Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода" и за ментора ове докторске дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а.

19.10.2015. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Наташе Ж. Шекуљице, маг. инж. технологије, под називом "Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода".

14.4.2016. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је Одлука о именовању Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Наташе Ж. Шекуљице, маг. инж. технологије, под називом "Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода".

Кандидат је уписао докторске студије 14.10.2011. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Зорица Кнежевић-Југовић, професор ТМФ-а).

1.2. Научна област дисертације

Истраживања изведена у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство (ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија) за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За ментора је изабрана др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор ТМФ-а који је на основу публикација у релевантним научним часописима и истраживачког искуства у овој области компетентна да руководи израдом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Наташа Шекуљица рођена је 02.10.1987. године у Задру. Основну школу „Бошко Палковљевић Пинки“ завршила је у Старој Пазови, а средњу медицинску школу је у завршила Земуну 2006. године. Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 2006/2007. године. Дипломирала је на Технолошко-металуршком факултету, на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију 24.09.2010. са просечном оценом студирања 8,42. Завршни рад на тему "Производња протеазе из *Pseudomonas san-ai* и њена примена у детергентима" под руководством ментора проф. др Зорице Кнежевић-Југовић одбранила је оценом 10. Мастер рад на тему "Карактеризација липаза из *Rhizopus oryzae* гајеним субмерзним поступком ферментације" под руководством истог ментора одбранила је 19.07.2011. године оценом 10. По завршетку редовних студија, 25.10.2011. године је уписала докторске студије Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,45, као и завршни рад са темом "Уклањање синтетичких боја из отпадних вода пероксидазом из рена" оценом 10. На Хемијском факултету Универзитета у Београду у мају 2013. године положила је испит и стекла лиценцу Светник за хемикалије.

Од марта 2012.године до октобра 2014. године ангажована је као стипендиста на пројекту Министарства просвете и науке Републике Србије бр. ИИИ 46010, под називом "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности". Од октобра 2014. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач приправник на пројекту "Електрохемијска синтеза и карактеризација наноструктурираних функционалних материјала за примену у новим технологијама" (ОН 172046). У звање истраживач сарадник изабрана је 09.04.2015. године. Коаутор је осам радова у међународним часописима (три М21, два М22, два М23 и један М24) и девет саопштења на домаћим и међународним скуповима (три М33, три М34, један М63 и два М64).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација Наташе Шекуљица написана је на 247 страна, са укупно 12 поглавља, 90 слика, 20 табела и 290 литературна навода. Докторска дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Теоријски део, Материјале и методе, Резултате и дискусију, Закључак и Литературу, уз изводе на српском и енглеском језику.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације је приказано порекло и обим једног од водећих еколошких проблема данашњице, отпадних вода. Водени токови (реке и језера) су под константним притиском загађења отпадним, непречишћеним водама из урбаних насеља, индустрије, као и пестицидима са пољопривредних површина. Текстилна индустрија је грана индустрије у којој се процесуира велика количина воде и при томе она напушта систем загађена бројним штетним реагенсима и обојена синтетичким бојама. Присуство синтетичких боја у отпадним водама изазива највећу забринутост јер су оне саме као и њихови производи разградње токсични, канцерогени и мутагени за живе организме. Поред тога, синтетичке боје спадају у групу изузетно стабилних једињења због чега се задржавају у води дуг временски период, па могу испољити акутне и хроничне ефекте на изложене организме. У овом поглављу је приказан утицај испуштене делимично пречишћене или непречишћене отпадне воде у околне водотокове на животну средину, водене организме и човека. На крају поглавља описани су недостаци традиционалних метода за уклањање синтетичких боја и представљени су циљеви рада са планом истраживања.

У **Теоријском делу** детаљно је приказана структура и класификација синтетичких боја, са посебним освртом на значај и примену антрахинонских боја. Посебна пажња посвећена је утицају синтетичких боја на здравље човека и животну средину. Приказан је преглед актуелних метода уклањања синтетичких боја из отпадних вода. Примена ензима, пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) (ЕС 1.11.1.7), као еколошки прихватљиве и ефикасне методе захтева детаљан приказ структуре и каталитичког механизма изабраног биокатализатора у циљу што бољег разумевања и унапређења процеса катализованог пероксидазом из рена. У наставку, потенцијал примене пероксидазе из рена објашњен је кроз преглед актуелних области њене примене, како у третману отпадних вода, тако и у органским синтезама, биосензорима, прехранбеној индустрији и другим. Поред ефикасности и специфичности, разлог интензивне примене пероксидазе из рена у поређењу са пероксидазама из других извора је и лака доступност по приступачној цени. Реакција обезбојавања антрахинонских боја припада бисупстратним реакцијама, па је у оквиру посебног поглавља описана теоријска основа кинетике ензимских бисупстратних реакција. Повећање стабилности биокатализатора различитим техникама имобилизације је следеће поглавље Теоријског дела. Поред приказаних и објашњених техника имобилизације примењених у имобилизацији пероксидазе из рена, дат је и преглед литературе везан за биокаталитичку примену имобилисане пероксидазе у третману отпадних вода. Област примене слободне и имобилисане пероксидазе из рена која се налази у узлазној фази, ензимске горивне ћелије, приказана је на крају теоријског дела.

Експериментални део дисертације подељен је на два дела. У првом делу, **материјали и инструменти** детаљно су приказани сви материјали и инструменти коришћени у изради дисертације. **Методе** је посебна целина експерименталног дела дисертације у оквиру које су детаљно приказане све методе које су примењиване у току експерименталног рада, према редоследу експерименталног рада као и начини обраде резултата. Прво су описани поступци одређивања оптималних услова примене слободне пероксидазе из рена (комерцијалне, непречишћене) у обезбојавању модел антрахинонске боје. Слободан ензимски препарат (комерцијални и непречишћен) окарактерисан је у посматраној реакцији са аспекта утицаја времена контакта, концентрације ензима, концентрације боје, рН, концентрације водоник-пероксида и температуре. Добијени резултати су искоришћени за планирање и извођење наредне експерименталне серије. Детаљно објашњење поступака имобилизације препарата

пероксидазе из рена приказано је у наредним поглављима. Поступак имобилизације пероксидазе из рена (комерцијални препарат) адсорпцијом на метакаолин детаљно је објашњен кроз испитивање утицаја рН и почетне концентрације ензима на ефикасност добијеног имобилисаног препарата. Носач након припреме за имобилизацију (термички третман) и након адсорпције окарактерисан је SEM, BET и FT-IR анализама. Најефикаснији имобилисани препарат примењен је у конкретној реакцији уклањања синтетичке боје где је кроз низ експеримената испитан утицај имобилизације и карактеристике имобилисане пероксидазе у поређењу са слободним ензимским препаратом примењеним у истој реакцији. Методе имобилизације пероксидазе из рена на метакаолин активиран глутаралдехидом и умрежавање у облику ензимских агрегата су детаљно објашњене у поглављима која следе. У оквиру ове дисертације посебна пажња је посвећена и карактерисању испитиваних узорка са аспекта токсичности. Метода по којој је испитивана токсичност (хемијска потрошња кисеоника, ХПК, укупни органски угљеник, УОУ) и токсичност коришћењем *A.salina* цисти су посебно објашњене. На крају, велики потенцијал примене пероксидазе из рена у обезбојавању синтетичких боја куплован је са горивном ћелијом и конструисана је ензимска горивна ћелија пероксидазе из рена имобилисане на бакар-сулфидну электроду. Целокупан експериментални поступак модификације пероксидазе, припрема бакар-сулфидне електроде, имобилизација пероксидазе, имплементација имобилисане пероксидазе у горивну ћелију и оперативни режим рада детаљно су описани у посебном поглављу метода.

У оквиру поглавља **Резултати и дискусија** ове докторске дисертације приказани су добијени експериментални резултати. Приказ добијених резултата обухвата и њихову анализу и дискусију која подразумева објашњење и поређење са литературним наводима сличне тематике. Ово поглавље се дели на пет поглавља: 1) Примена слободне пероксидазе у реакцији обезбојавања испитиване антрахинонске боје, 2) Имобилизација пероксидазе из рена на макропорозни носач, каолин, адсорпцијом и претходним третманом носача глутаралдехидом, 3) Ковалентна имобилизација пероксидазе из рена без примене носача, методом умрежених ензимских агрегата, 4) Токсиколошка анализа узорка пре и након ензимског третмана, 5) Ензимска горивна ћелија имобилисане пероксидазе из рена на бакар-сулфидну электроду.

У оквиру **првог поглавља** приказани су резултати добијени испитивањем примене слободне пероксидазе у реакцији обезбојавања антрахинонских боја. Испитана је могућност примене комерцијалног препарата и непречишћене пероксидазе изоловане из свежег екстракта рена у реакцији обезбојавања модел синтетичке антрахинонске боје, C. I. Acid Violet 109 (AV 109). Експериментални резултати утицаја времена контакта, концентрације ензима, концентрације боје, концентрације водоник-пероксида, температуре и рН на ефикасност пероксидазе која се огледа, како у повећању степена обезбојавања, тако и смањењу токсичности испитиваног раствора боје, приказани су у оквиру овог поглавља. Да би се описало кинетичко понашање система са слободном пероксидазом и да би се омогућило касније квантитативно поређење са имобилисаним системима са пероксидазом у овом раду као и у литератури, испитана је почетна кинетика реакције обезбојавања AV 109 боје катализована слободном комерцијалном и непречишћеном пероксидазом из свежег екстракта. На добијене резултате примењени су различити кинетички модели ензимских бисупстратних реакција попут секвенцијалног и пинг понг би би механизма, који узимају у обзир инхибицију бојом и/или водоник-пероксидом. Усвојен је модел који најбоље описује ензимску реакцију обезбојавања под датим условима и представљене су вредности кинетичких константи попут максималних брзина, Михаелисових константи за оба супстрата и константи инхибиције за боју и водоник-пероксид.

У **другом поглављу** приказани су резултати који се односе на повећање стабилности пероксидазе њеном имобилизацијом на макропорозни носач, каолин. Коришћена су два поступка имобилизације и то: 1) адсорпција и 2) умрежавање ензима и носача глутаралдехидом. Обе технике имобилизације су оптимизоване у погледу услова имобилизације. Адсорпција пероксидазе из рена на каолин испитана је са аспекта утицаја рН смеше за имобилизацију и концентрације ензима. Носач за имобилизацију је активиран термичким третманом при чему су праћене морфолошке промене као и промене у садржају функционалних група савременим методама попут скенирајуће електронске микроскопије, SEM, BET адсорпције и Фуријеове инфрацрвене спектроскопије, FT-IR, као и код узорака добијених након имобилизације пероксидазе. Примена и ефикасност добијеног имобилисаног препарата испитана је у реакцији обезбојавања изабране антрахинонске боје. Одређени су оптимални услови (време контакта, концентрација боје, концентрација водоник-пероксида и рН реакционе смеше) за обезбојавање AV 109 боје имобилисаном пероксидазом и упоређени са вредностима добијеним за слободан ензим. Поред тога, праћењем почетне кинетике утврђене су вредности кинетичких константи имобилисане пероксидазе у посматраној реакцији. Поступак имобилизације пероксидазе на каолин активиран глутаралдехидом је оптимизован са аспекта испитивања утицаја почетне концентрације глутаралдехида употребљеног за модификацију и почетне концентрације ензима. Приказан је утицај наведених параметара на масу везаног ензима и специфичну активност добијеног имобилисаног препарата. Затим је имобилисани биокатализатор примењен у реакцији обезбојавања. Одређени су оптимални услови, степен обезбојавања и добијени резултати су упоређени са условима добијеним за реакцију обезбојавања катализовану слободном пероксидазом и пероксидазом имобилисаном адсорпцијом на каолин. Поред оптималних услова обезбојавања, испитана је и оперативна стабилност која представља лимитирајући фактор када је у питању примена имобилисаних биокатализатора у индустријским процесима.

Треће поглавље садржи резултате везане за имобилизацију пероксидазе из рена без примене носача, умрежавањем у облику агрегата и примену у обезбојавању раствора модел антрахинонске боје. Параметри од значаја који су оптимизовани у овој методи имобилизације су: утицај таложног реагенса, утицај почетне концентрације умрежавајућег реагенса и додатак инертног протеина попут говећег серум албумина. Праћен је утицај наведених параметара на степен умрежавања, задржану активност и оперативну стабилност добијених умрежених агрегата. Пероксидаза из рена је имобилисана под оптималним условима имобилизације и испитана у реакцији обезбојавања антрахинонске боје. Добијени експериментални подаци оптимизованог процеса обезбојавања умреженом пероксидазом су приказани и упоређени са ефикасности претходне пероксидазе имобилисане везивањем за носач и литературним подацима. Оптимални услови обезбојавања испитани су у шаржном реактору са орбиталним мешањем, док су умрежени агрегати пероксидазе из свежег екстракта рена успешно примењени и у конфигурацији реактора са пакованим слојем са рецикулацијом реакционе смеше. Такође, приказани су и резултати оперативне стабилности имобилисане пероксидазе у облику умрежених ензимских агрегата у реакцији обезбојавања и реакцији оксидације пирогалола.

Уклањање синтетичких боја из раствора је један од задатака када су обојене отпадне воде у питању. Поред тога, врло често се дешава да након третмана раствори постају знатно токсичнији од полазних. Из тог разлога, од изузетног значаја је било испитати токсичност раствора пре и након ензимског третмана. Сходно томе, **четврто поглавље** је посвећено токсиколошким анализама узорака пре и након ензимског третмана. У узорцима је испитана хемијска потрошња кисеоника, укупан органски угљеник и

акутна токсичност коришћењем *A.salina* цисти и добијени резултати су приказани у оквиру четвртог поглавља резултата и дискусије.

У **петом поглављу** приказани су резултати купловања имобилисане пероксидазе у ензимској горивној ћелији у којој је као супстрат коришћена антрахинонска боја AV 109. У сврху имобилизације пероксидазе из рена на бакар-сулфидну электроду извршена је редукција ензима да би се повећао садржај сулфхидрилних група преко којих је извршено везивање ензима за носач. Након припреме, модификована пероксидаза је ковалентно имобилисана на бакар-сулфидну электроду. У оквиру овог поглавља детаљно је објашњен поступак добијања бакар-сулфидне електроде, активације и имобилизације пероксидазе на электроду и конструкција ензимске горивне ћелије. Детаљно је објашњен оперативни режим рада горивне ћелије и приказани су постигнуте вредности обезбојавања, специфичне снаге и оствареног напона ћелије.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Загађење животне средине отпадним водама представља водећи еколошки проблем данашњице. Отпадне воде представљају саставни део сваке гране индустрије. Водећа грана индустрије по количини и загађености отпадних вода је текстилна индустрија. Поред агресивних једињења као што су површински активне материје, јони метала, детергенти, уља и масти, пестициди, растварачи, феноли, цијаниди, киселине, базе, отпадна вода текстилне индустрије садржи и канцерогене, мутагене и токсичне синтетичке боје које дају интензивно обојење у изузетно ниским концентрацијама. Конвенционалне методе пречишћавања отпадних вода текстилне индустрије су неефикасне и врло често настају секундарни проблеми загађења, активни муљ. Строге законске регулативе које се односе на степен загађености отпадних вода прихватљив за испуштање у водене токове наводе бројне истраживаче у овој области да разматрају и развијају еколошки прихватљиве и економски оправдане технологије пречишћавања отпадних вода попут ензимских технологија. Поред бројних области у којима су нашли примену, ензими као биокатализатори постају незамењиве алатке и у заштити животне средине и биоремедијацији.

Ензими из групе оксидо-редуктаза (EC 1.11.1.X) катализују реакције оксидације синтетичких боја. Пероксидаза из рена (*Armoracia rusticana*) је један од најчешће примењиваних ензима у сврху уклањања синтетичких боја. Разлог томе је строга специфичност, ефикасност и лака доступност ензима. Поред пероксидазе из рена, оксидо-редуктазе као лаказе, тирозиназе и азо-редуктазе такође се примењују у уклањању синтетичких боја, али са нижим степеном ефикасности јер су врло често супстрати (боје) високо токсични за микроорганизам продуцент циљаног ензима. Међутим, веома мало радова у литератури се односи на ензимску разградњу антрахинонских боја, које су друге по заступљености у отпадним водама, одмах након азо боја. На основу нашег увида у литературу готово да нема података о разградњи антрахинонских боја и утицаја њихове структуре на степен разградње у рекацијама катализованим комерцијалном пероксидазом из рена.

Главна препрека за примену пероксидазе из рена у третману обојених отпадних вода је мала оперативна стабилност биокатализатора услед повећане осетљивости ензима на супстрат и производе реакције. У циљу превазилажења наведеног проблема имобилизацијом различитим техникама (адсорпције, ковалентне имобилизације) на

различите носаче добијени су биокатализатори унапређених својстава (повећана оперативна стабилност и могућност рециклирања на првом месту) у поређењу са слободним ензимом са потенцијалном применом у већим размерама процеса, на индустријском нивоу.

Антрахинонске боје се налазе на другом месту по примени у текстилној индустрији и заступљености у отпадним водама, изузетно су стабилне због кондензованих ароматичних прстенова у структури, па су у оквиру ове дисертације изабране као модел за истраживање. Пероксидаза, комерцијални и непречишћени препарат из сировог екстракта, слободна и имобилисана примењена је у уклањању испитиване боје. У циљу смањења трошкова процеса, испитана је ефикасност пероксидазе из свежег екстракта рена у уклањању антрахинонске боје. Непречишћена пероксидаза из свежег екстракта рена је први пут испитана у реакцији обезбојавања синтетичких боја у оквиру ове докторске дисертације. Добијени резултати показују да је ефикасност у обезбојавању антрахинонске боје нижа за ~15 % у поређењу са реакцијом обезбојавања катализованом комерцијалном пероксидазом, али поређењем цене примене комерцијалне и непречишћене пероксидазе јасно је да непречишћен ензим има велики потенцијал за примену у наведеном процесу.

У циљу повећања стабилности пероксидазе изабрана је имобилизација на макропорозну глину, каолин. Детаљним прегледом литературе утврђено је да не постоје подаци везани за примену каолина у имобилизацији пероксидазе за примену у обезбојавању отпадних вода. Имобилизацијом пероксидазе на каолин адсорпцијом и умрежавањем глутаралдехидом добијени су резултати који указују на велики потенцијал примене ових техника имобилизације и каолина у третману обојених отпадних вода на индустријском нивоу. Имобилизацијом, инхибиторни утицај супстрата је значајно смањен, имобилисани биокатализатор је било могуће применити у 7 узастопних циклуса што указује на значајно повећање оперативне стабилности. Применом пероксидазе имобилисане на каолин адсорпцијом уклоњено је 11,3 mg боје што је 4,2 пута више него слободном пероксидазом, 2,7 mg. Анализом економичности процеса изводи се закључак да је примена глине, каолина, која је широко распрострањена у земљишту (лако доступна) знатно јефтинија у поређењу са комерцијалним синтетичким носачима примењеним за имобилизацију пероксидазе из рена. На основу свега јасно је да је у оквиру ове докторске дисертације развијен имобилисани биокатализатор апликативан у третману обојених отпадних вода.

Прегледом литературе пронађени су подаци о имобилизацији пероксидазе на различите природне и синтетичке носаче, али нема података о имобилизацији овог ензима умрежавањем без коришћења чврстог носача. У овој докторској дисертацији примењена је први пут техника имобилизације пероксидазе из рена преко стварања умрежених ензимских агрегата без примене носача. Добијени резултати су значајно бољи у поређењу са резултатима из литературе добијеним умрежавањем лаказа и тирозиназа у облику умрежених ензимских агрегата. Овако имобилисана пероксидаза је успешно примењена, поред шаржног, и у реактору са пакованим слојем са рецикулацијом реакционе смеше, где је након седам циклуса примене, задржана активност износила 60 % у односу на почетну.

Уклањање обојености из отпадних вода не мора нужно да указује на смањење токсичности раствора након ензимског третмана. Анализирањем узорака пре и после ензимског третмана потврђена је редукција вредности хемијске потрошње кисеоника као и укупног органског угљеника након ензимског третмана. Смањење токсичности додатно је потврђено испитивањем токсичности коришћењем живих организама (*A. salina*) као индикатора. На овај начин потврђена је такође знатно нижа токсичност у узорку након ензимског третмана. Наиме, узорак пре ензимског третмана се

класификује као токсичан ($25 > EC_{50} < 75 \%$), док је узорак након ензимског третмана класификован као узорак ниске токсичности ($100 > EC_{50} > 75 \%$).

Примена пероксидазе из рена у биосензорима и имунодијагностици је високо развијена област. Међутим, примена пероксидазе из рена у ензимским горивним ћелијама, где се као супстрат користи отпадна обојена вода је нова област примене у узлазној фази истраживања. У оквиру ове дисертације, пероксидаза из рена је имобилисана на бакар-сулфидну електроду и примењена у ензимској горивној ћелији. Као резултат постигнуто је следеће: обезбојавање $\sim 40 \%$, специфична енергија ћелије $\sim 5 \text{ mWh m}^{-2}$, максимална специфична снага $\sim 1 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$ и напон отвореног струјног кола $0,51 \text{ V}$, што указује на потребу да се интензивно настави истраживање у овој области са циљем искоришћења отпадних вода као горива за генерисање електричне енергије уз симултано пречишћавање истих.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитирана су 290 литературна навода који су омогућили да се представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Савремена истраживања публикована у цитираним научним радовима су приказана, анализирана и дискутована и изведени су закључци који су дали добар увид у могућност примене пероксидазе из рена у третману обојених отпадних 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 области истраживања и актуелног стања истраживања у овој конкретној области.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

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

Поступци испитивања оптималних услова обезбојавања и имобилизације пероксидазе су рађени по објављеним процедурама као и оригиналним методама оптимизованим у току експерименталног рада. Проценат обезбојавања раствора праћен је спектрофотометријски на карактеристичном апсорпционом максимуму боје снимањем UV спектра. Носач употребљен за имобилизацију као и добијени имобилисани препарати окарактерисани су стандардним методама за одређивање специфичне површине, порозности и морфологије (BET, SEM), док је образовање потенцијалних веза између носача и ензима потврђено Фуријеовом инфрацрвеном спектроскопијом (FT-IR). Кинетичка анализа заснивала се на експерименталном плану који се састојао из варирања једног параметра при константној концентрацији другог у циљу утврђивања постојања инхибиције супстратом. Оперативна стабилност биокатализатора испитивана је у низу консекутивних реакција под претходно дефинисаним реакционим условима. Активност биокатализатора одређивана је спектрофотометријски, праћењем оксидације пирогалола до пурпурогалина. Садржај протеина праћен је стандардном Лоријеовом (Lowry) методом. Узорци пре и након ензимског третмана окарактерисани су и са аспекта токсичности при чему су за одређивање хемијске потрошње кисеоника и акутне токсичности коришћењем *A.salina* цисти примењене доступне публиковане методе, док

је за одређивање укупног органског угљеника коришћена стандардизована метода, SRPS ISO 8245:2007. Бакар-сулфидна електрода је синтетисана галваностатски, а површина електроде приказана је снимањем оптичким микроскопом. Хемијски састав синтетисаног бакар-сулфида анализиран је електронском дисперзионом спектроскопијом, EDS анализом.

3.4. Применљивост остварених резултата

На основу прегледа литературних података и експерименталних резултата приказаних у оквиру ове дисертације, остварен је значајан практични допринос примени пероксидазе из рена као биокатализатора реакција уклањања синтетичких боја из отпадних вода. У оквиру ове тезе унакрсно је приказана ефикасност комерцијалног препарата пероксидазе и ензима изолованог из свежег екстракта рена у обезбојавању отпадних вода. У потпуности су оптимизовани услови за добијање имобилисане пероксидазе применом две технике, адсорпције на чврст макропорозни носач, каолин, и умрежавањем ензима и каолина глутаралдехидом. Значајан напредак постигнут је у области ковалентне имобилизације пероксидазе техником умрежавања у облику ензимских агрегата, без примене носача за имобилизацију. На овај начин добијени имобилисани биокатализатор изузетних перформанси (оперативна стабилност, могућност рециклирања) је успешно примењен у третману обојених отпадних вода. Развој ове технике имобилизације представља изузетан допринос практичној примени имобилизације пероксидазе из рена у уклањању загађивача воде као што су синтетичке боје. Велики допринос ове технике огледа се у добијању биокатализатора са великим потенцијалом примене у шаржном биореактору и биореактору са пакованим слојем са рецикулацијом реакционе смеше без употребе скупих синтетичких носача за имобилизацију и уз добијен висок проценат каталитички активне масе биокатализатора. Тиме се постижу велики просторно-временски приноси биореактора, што је од великог значаја за имплементацију ових процеса у третманима отпадних вода у индустријским размерама.

Поред уклањања испитиване боје у високом проценту (~ 94 %), постигнути су и значајни резултати у смањењу токсичности раствора након ензимског третмана (~ 80 %), што указује на могућност безбедног испуштања третираних отпадних вода у околне водотокове без бојазни да ће се нарушити процеси фотосинтезе или да ће доћи до инхибиције раста и мутација водених организама.

Из ове докторске дисертације, поред развоја неколико ефикасних ензимских система са слободном и имобилисаном пероксидазом за смањење обојености и токсичности отпадних вода, може да се оствари још један бенефит. Наиме, познато је да проналазак обновљивих и еколошки прихватљивих извора енергије у циљу замене за фосилна горива представља један од водећих изазова данашњице. Имобилисана пероксидаза из рена примењена је први пут у горивној ћелији у којој се као супстрат користи отпадна вода обојена антрахинонском бојом. На овај начин поред обезбојавања, смањења токсичности, симултано је генерисана и електрична енергија. Примена пероксидазе из рена на овај начин у оквиру ове тезе, отвара нову област примене овог биокатализатора.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Наташа Шекуљица, мастер инжењер технологије, је током израде докторске дисертације показала самосталност у креирању и реализацији експеримената, као и анализи и обради резултата. Приликом извођења експеримената показала је и да влада научним и истраживачким методама, као и да поседује потребна стручна, теоријска и

практична знања за самосталан научни рад. Приликом развоја постојећих и осмишљавања нових експерименталних поступака, испољила је склоност ка инжењерском начину размишљања. Свеобухватни и систематизовани преглед литературе из области истраживања, показује способност кандидата за самостално откривање и сагледавање отворених проблема истраживања, као и критичку анализу постојећих сазнања. На основу досадашњег ангажовања и остварених резултата, Комисија сматра да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Научним доприносом резултата ове тезе може се сматрати следеће:

- У овој докторској дисертацији испитан је и оптимизован оригинални поступак примене пероксидазе из рена, како комерцијалног препарата, тако и ензима из свежег екстракта, у уклањању синтетичке антрахинонске боје из отпадних вода. Добијени резултати (~ 94 % обезбојавање) су истог реда величине или значајно већи у поређењу са постигнутим резултатима са системима других оксидо-редукционих ензима из литературе што указује на велики потенцијал пероксидазе из рена у третману обојених отпадних вода;
- Кинетика реакције обезбојавања антрахинонске боје катализована комерцијалном пероксидазом из рена је по први пут детаљно проучена, а установљени кинетички модел указује да постоје разлике у механизму између ове ензимске и реакција катализованих другим оксидо-редукционим ензимима из литературе;
- Кандидат је својим резултатима дао допринос науци, пре свега у области развоја неколико имобилисаних система, како са комерцијалном пероксидазом из рена, тако и сировим ензимом из екстракта рена, и њихове примене у реакцији обезбојавања антрахинонске боје;
- Развијени су оригинални поступци имобилизације комерцијалне пероксидазе из рена на макропорозни носач, каолин, који се заснивају на адсорпцији ензима на термички претретиран носач или на његовој претходној хемијској активацији глутаралдехидом. Велики проценат задржане активности ензима у оба случаја, велике количине везаног ензима, као и изразита стабилност ових имобилисаних система при узастопном коришћењу у поновљеним циклусима представљају значајан научни допринос у погледу развоја техника имобилизације и отварају нове могућности примене имобилисаних пероксидаза као биокатализатора;
- Развијен је оригинални поступак за имобилизацију пероксидазе из рена умрежавањем молекула ензима помоћу бифункционалних агенаса без примене чврстог носача у *тзв.* умрежене ензимске агрегате. Пажљивом оптимизацијом параметара имобилизације развијен је биокатализатор унапређених својстава у поређењу са слободним ензимом. Апликативност добијеног биокатализатора испитана је и потврђена у директној реакцији обезбојавања антрахинонске боје у шаржном реактору са орбиталним мешањем и у пакованом реактору са рецикулацијом реакционе смеше. Примена умрежених ензимских агрегата пероксидазе изоловане из свежег екстракта рена представља значајан научни допринос јер је без примене скупих синтетичких носача, приметних поступака активација носача и ензима, развијен имобилисани биокатализатор који је било

могуће применити кроз осам узастопних циклуса обезбојавања антрахинонске боје у пакованом реактору са задржаном активности од ~ 60 %.

- Утврђено је да долази до смањења токсичности у испитиваним растворима након ензимског третмана услед разлагања боје, што је верификовано стандардним хемијским и биолошким методама;
- Резултати ове тезе доприносе разумевању механизма и кинетике обезбојавања антрахинонске боје у различитим системима са имобилисаном пероксидазом, нарочито врстама и ефектима инхибиције, као и оптимизацији конфигурације и одговарајућег режима рада биореактора. Показано је да механизам и јачина инхибиције зависе, не само од својстава биокатализатора, него да значајну улогу, у том смислу, имају својства носача. Применом имобилисане пероксидазе на каолину адсорпцијом у реакцији обезбојавања утврђено је да је степен инхибиције супстратом након имобилизације значајно умањен. Развој адекватног кинетичког модела који описује комплетан ток реакције представља оригинални научни допринос ове докторске дисертације због могућности пројектовања ензимских биореактора за примену у већим размерама процеса.
- Посебан научни допринос ове докторске дисертације је развој ензимске горивне ћелије. У оквиру ове дисертације први пут је за имобилизацију пероксидазе из рена искоришћена бакар-сулфидна електрода. Развијен је оригинални поступак ковалентне имобилизације пероксидазе преко сулфхидрилних група ензима које се добијају при његовој претходној редукцији. Бакар-сулфидна електрода је имплементирана у горивну ћелију која као супстрат троши отпадну воду обојену антрахинонском бојом. Као резултат купловања имобилисане пероксидазе, горивне ћелије и отпадне воде као супстрата постигнуто је обезбојавање ~ 40 %, специфична енергија ћелије ~ 5 mWh m⁻², максимална специфична снага ~ 1 μW cm⁻² и напон отвореног струјног кола 0,51 V. Добијени резултати представљају добру основу за истраживања у области примене отпадних вода као обновљивих извора енергије у којима се користи еколошки прихватљив катализатор, пероксидаза из рена, али и други ензими.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Дефинисањем циљева истраживања утврђена је методологија истраживања примењена током израде докторске дисертације. Детаљним прегледом доступне литературе из ове области истраживања која разматра примену пероксидазе из рена у третману обојених отпадних вода, као и разматрањем резултата истраживања добијених применом одабране методологије у оквиру ове дисертације, може се приметити да се добијени резултати надовезују, али и значајно надопуњују постојеће резултате. На тај начин, ова докторска дисертација представља важан корак ка практичној примени имобилисане пероксидазе у третману обојених отпадних вода и горивним ћелијама али и отвара нове могућности за даља истраживања.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Наташа Шекуљица је резултате истраживања остварене у оквиру израде ове докторске дисертације потврдила објављивањем десет радова публикованим у часописима међународног значаја или саопштеним на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања који су део дисертације објављени су до сада у оквиру шест радова у међународним часописима и четири саопштења на скуповима

међународног или националног значаја. Резултати из ове докторске дисертације добијени за готово сваки новоразвијени ензимски систем са слободном и/или имобилисаном пероксидазом за обезбојавање антрахинонске боје су публиковани у међународном раду. Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру уже научне области биохемијског инжењерства и биотехнологије у оквиру којих је коаутор још два рада у часописима међународног значаја и пет саопштења на скуповима међународног или националног значаја.

Научни радови који су део дисертације:

Категорија M21:

1. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Andrea B. Stefanović, Milena G. Žuža, Dragana Z. Čičkarić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, "Decolorization of anthraquinonic dyes from textile effluent using horseradish peroxidase: Optimization and kinetic study", *The World Scientific Journal*, vol. 2015, Article ID 371625, 12 pages, 2015, IF (2013)=1,219, ISSN: 2356–6140.
2. **Nataša Ž. Šekuljica**, Milica M. Gvozdenović, Zorica D. Knežević-Jugović, Branimir Z. Jugović, Branimir N. Grgur, "Biofuel cell based on horseradish peroxidase immobilized on copper sulfide as anode for decolorization of anthraquinone AV 109 dye", *Journal of Energy Chemistry*, vol. 25, 2016, pp. 403–408, IF (2014)=2,352, ISSN: 1003–9953.
3. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Sonja M. Jakovetić, Sanja Ž. Grbavčić, Nevena D. Ognjanović, Zorica D. Knežević-Jugović, Dušan Ž. Mijin, Removal of anthraquinone dye by cross-linked enzyme aggregates from fresh horseradish extract, *Clean Soil Air Water*, vol. 44, 2016, pp. 1–10, IF (2014)=1,945, 2016, ISSN: 1860–0650.

Категорија M22:

4. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, Andrea B. Stefanović, Veljko R. Đokić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, "Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 39, pp. 461–472, 2016, IF (2014)=1,997, ISSN: 1615–7605.

Категорија M23:

5. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, Andrea B. Stefanović, Sanja Ž. Grbavčić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović: "Immobilization of horseradish peroxidase by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye" *Hemijaska industrija*, doi:10.2298/HEMIND150220028S, 2015, IF (2014)=0,364, ISSN: 2217–7426.

Категорија M24:

6. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Nevena M. Lukić, Aleksandra M. Jakovljević, Sanja Ž. Grbavčić, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, "Immobilization of peroxidase from fresh horseradish extract for anthraquinone dye decolorization", *Zaštita Materijala*, vol. 56, 2015, pp. 335–339, IF (2014)=0,688, ISSN: 0351–9465.

Категорија M33:

7. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Jelena R. Jovanović, Andrea B. Stefanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, "Kaolin as a support for the immobilization of horseradish peroxidase: Application in anthraquinonic dyes decolorization from wastewater", IV INTERNATIONAL CONGRESS, ENGINEERING, ECOLOGY AND

MATERIALS IN THE PROCESSING INDUSTRY, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04.03.-06.03. 2015, Proceedings, p. 287–292, ISBN 978-99955-81-18-3.

Категорија M34:

8. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Andrea B. Stefanović, Jelena J. Jovanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, "Dekolorizacija antrahinonskih boja iz otpadnih voda imobilisanom peroksidazom iz rena", XI simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Zbornik izvoda radova str.67, 22-24.10.2015, Leskovac.

Категорија M64:

9. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, "Dekolorizacija antrahinonskih boja peroksidazom iz rena imobilisanom na kaolin", 51. Savetovanje Srpskog Hemijskog društva, Niš 5-7. Juni 2014, Kratki izvodi radova, str. 69, ISBN 978-86-7132-054-2.
10. **Nataša Ž. Šekuljica**, Nevena Ž. Prlainović, Andrea B. Stefanović, Jelena R. Jovanović, Dušan Ž. Mijin, Zorica D. Knežević-Jugović, Obezbojavanje antrahinonskih boja peroksidazom izolovanom iz svežeg ekstrakta rena, 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 29.i 30.maj 2015. Kratki izvodi radova, str. 100, ISBN 978-86-7132-056-6.

Остали научни радови кандидата:

Категорија M22:

11. Andrea B. Stefanović, Jelena R. Jovanović, Sanja Ž. Grbavčić, **Nataša Ž. Šekuljica**, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović, "Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production", *European Food Research and Technology*, vol. 239, pp. 979–993, 2014, IF (2014)=1,559, ISSN: 1438–2377.

Категорија M23:

12. Jovanović R. Jelena, Stefanović B. Andrea, Žuža G. Milena, Jakovetić M. Sonja, **Šekuljica Ž. Nataša**, Bugarski M. Branko, Zorica D. Knežević-Jugović, "Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration", *Hemijska industrija*, DOI:102298/HEMIND150506047J, 2015, IF (2014) =0,364, ISSN: 2217–7426.

Категорија M33:

13. Zorica D. Knežević-Jugović, Jelena R. Jovanović, Andrea B. Stefanović, Milena G. Žuža, **Nataša Ž. Šekuljica**, Verica B. Manojlović, Branko M. Bugarski, "Antioxidant activity of peptide fractions obtained by membrane ultrafiltration of egg white protein enzymatic hydrolysates", IV INTERNATIONAL CONGRESS, ENGINEERING, ECOLOGY AND MATERIALS IN THE PROCESSING INDUSTRY, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 04.03.-06.03. 2015, Proceedings, p. 278–286, ISBN 978-99955-81-18-3.
14. Jovanović, J., Stefanović, A., Grbavčić, S., **Šekuljica, N.**, Elmalimadi, M., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z.: Peptides with improved antimicrobial activity screened by membrane ultrafiltration from egg white protein hydrolysates, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranske Matliare, Slovakia, May 25-29*, 732–739, 2015, ISBN: 978-80-89475-14-8.

Категорија M34:

15. Nevena Luković, Sonja Jakovetić, Sanja Grbavčić, Jelena Jovanović, Andrea Stefanović, **Nataša Šekuljica**, Zorica Knežević-Jugović, "Production of antioxidative egg-white

hydrolysates in a circle batch membrane reactor", 7th *Central European Congress Food-CEFood, Food Chain Intergadion*, Ohrid, Macedonia, 21-24 May 2014, Book of Abstract, page 220, ISBN 987-608-4565-05-5.

16. Jelena Jovanović, Andrea Stefanović, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, **Nataša Šekuljica**, Milena Žuža, Zorica Knežević-Jugović, "Antioxidant activity and functional properties of peptides derived from egg white proteins by two-step enzymatic hydrolysis", *Food Quality & Safety, Health & Nutrition 1st Conference*, 27-29 November 2014, Skopje, Macedonia, Book of Abstract, page 76, ISBN 978-608-4565-06-2.

Категорија M63:

17. Jelena Jovanović, Andrea Stefanović, Milena Žuža, **Nataša Šekuljica**, Sonja Jakovetić, Nevena Luković, Zorica Knežević-Jugović, "Empirijski kinetički model hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima visoke frekvencije", *XIX Savetovanje o biotehnologiji*, Čačak 07-08. Mart 2014. Zbornik radova, Vol. 19, str. 281-285, ISBN 987-86-87611-31-3.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације Наташе Шекуљице, маг. инж., под називом "Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода" сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на конференцијама од међународног и националног значаја. 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 Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом "Ензимско обезбојавање антрахинонских боја из отпадних вода "кандидата Наташе Шекуљице прихвати, изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

.....
Проф. др Душан Мијин, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Проф. др Бранимир Гргур, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Радивоје Продановић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

.....
Др Невена Прлаиновић, научни сарадник
Иновациони Центар, Технолошко-металуршки факултет