

# НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета, Универзитета у Београду одржаној 12. новембра 2015. године изабрани смо у Комисију за оцену докторске дисертације **Милоша М. Прокопијевића**, дипломираног биохемичара, под насловом: „**Имобилизација пероксидазе из соје (*Glycine max*) на макропорозном глицидил-метакрилату и хемијски модификованом пектину**“. На основу прегледане дисертације подносимо Наставно-научном већу следећи:

## ИЗВЕШТАЈ

### А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Милоша М. Прокопијевића под наведеним насловом написана је на 114 страна А4 формата и садржи 55 слика, 6 табела и 108 литературних навода. Теза садржи следећа поглавља: 1. *Теоријски део*, 2. *Материјал и методе*, 3. *Резултати и дискусија*, 4. *Закључак*, 5. *Литература*. Поред наведеног дисертација садржи: *Садржај*, *Листу скраћеница коришћених у тексту*, *Захвалницу*, *Биографију* и у 3 прилога *Изјаву о ауторству*, *Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада* и *Изјаву о коришћењу*.

У **Теоријском делу** кандидат дефинише предмет истраживања и предложене циљеве тезе. Дат је осврт на област истраживања, наводи се реакција, структура, карактеристике и примена пероксидазе из соје познате из литературних података. Представљене су методе имобилизације ензима са посебним освртом на методе употребљене у тези, глутаралдехидна и перјодатна. Дат је преглед носача поготово глицидил-метакрилатних полимера и пектина који је хемијски модификован у овом раду, особине пектина и могућност прављења хидрогелова. У овом делу су представљени и основи ензимске кинетике и кинетике имобилизованих ензима.

Поглавље **Материјал и методе** садржи детаљно описане експерименталне процедуре и поступке коришћене у оквиру ове докторске тезе. Описане су процедуре изоловања ензима (пероксидазе из соје), све коришћене методе имобилизације,

модификација пектина перјодатом и тирамином и коришћене методе карактеризације добијеног полимера, као и мерења ензимске активности.

У поглављу **Резултати и дискусија** приказани су добијени резултати у оквиру четири дела. У првом делу је приказано изоловање и пречишћавање пероксидазе из љуспица соје. У другом делу су приказани резултати упоредне имобилизације пероксидазе из соје на макропорозном глицидил-метакрилату коришћењем две ковалентне методе имобилизације (глутаралдехидне и перјодатне) и карактеризација добијених имобилизата. У трећем делу је приказано добијање нове врсте модификованог пектина који може да формира хидрогелове хемијским умрежавањем јонима калцијума као и ензимским умрежавањем преко уведених фенолних група. Модификат пектина је окарактерисан UV-VIS спектроскопијом, FTIR анализом, <sup>1</sup>H NMR спектроскопијом, кисело базном титрацијом и електронском микроскопијом. Тирамин-пектин је коришћен као носач за енкапсулацију ензима у микро-куглицама хидрогела насталог ензимском полимеризацијом у емулзији воде у уљу. Имобилизати пероксидазе из соје на модификованом пектину су окарактерисани мерењем рН оптимума и кинетичких параметара реакције. Тестирана је и њихова температурна стабилност и стабилност у органским растварачима. У четвртом делу су резултати оптимизације реакције полимеризације фенола имобилисаним препаратима ензима у погледу количине имобилизованих ензимских јединица, количине и начина достављања водоник-пероксида у реакциони систем током уклањања фенола из воденог раствора.

У **Закључку** су укратко сумирани најзначајнији закључци проистекли из резултата истраживања.

У **Литератури** је наведено 108 цитата радова и књига из области истраживања која исцрпно покривају све делове докторске тезе.

## **Б. Кратак опис постигнутих резултата**

У оквиру првог дела докторске дисертације приказани су резултати пречишћавања пероксидазе из љуспица соје методом таложења органским растварачима и амонијум сулфатом. Чистоћа препарата је потврђена електорофретским а ензимска активност зимограмским техникама.

У другом делу је приказана оптимизација метода имобилизације пероксидазе из љуски соје на макропорозном глицидил метакрилату у погледу количине додатог

ензима, методе имобилизације и карактеристика површине коришћеног макропорозног глицидил-метакрилата у циљу добијања што активнијег и стабилнијег препарата имобилизованог ензима. Добијени препарат имобилизоване пероксидазе глутаралдехидном методом на макропорозном кополимеру са дијаметром пора на површини од 120 nm имао је највишу активност а такође и побољшану стабилности у условима повишене температуре и присуству органског растварача у односу на нативан, растворан облик ензима.

У трећем делу рада су синтетисани нови модификати пектина хемијском оксидацијом натријум-перјодатом и редуктивном аминацијом тирамином у присуству цијаноборхидрида. Нови полимери имају побољшану способност гелирања како у присуству двовалентних катјона тако и у ензимској полимеризацији катализованог пероксидазама преко новоуведених фенолних група молекула тирамина. Ова особина искоришћена је за прављење микро-куглица умрежавањем у емулзији и енкапсулацији пероксидазе из соје унутар насталог хидрогела. Имобилизат је показао већу термостабилност и стабилност у органском растварачу, као и шири опсег рН оптимума у односу на растворни облик ензима.

У четвртом делу дисертације приказани су резултати оптимизације реакције полимеризације фенола у погледу количине додатог ензима, количине и начина достављања водоник-пероксида у реакциони систем. Добијени препарати имобилизоване пероксидазе највеће активности и стабилности тестирани су у шаржном реактору за уклањање фенола из водених раствора.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе**

С обзиром на велики развој индустрије последњих деценија и повећаног загађења животне средине путем испуштања недовољно прерађених отпадних вода, долази до све веће потребе за проналажењем нових једноставнијих и јефтиних метода за третирање ове врсте загађења. Једна од често испитиваних метода је употреба пероксидаза у реакцијама полимеризације фенола у воденим растворима. Најчешће се користе биљне пероксидазе и то пероксидаза из рена и пероксидаза из соје која је посебно погодна због јефтиног извора и своје велике термостабилности. Како би се побољшала оперативна стабилност и употребљивост ових ензима развијају се различите методе имобилизације пероксидаза. Најчешће коришћене методе су

ковалентно везивање за макропорозне носаче и заробљавање унутар полимерних хидрогелова.

У оквиру ове дисертације прво је изолована пероксидаза из индустријског отпада при обради соје (љуспица) поступком двоструког таложења амонијум сулфатом и органским растварачем ацетоном. Активност и чистоћа добијеног препарата пероксидазе из соје је била у складу са сличним препаратима описаним у литератури.

Добијена пероксидаза је успешно имобилизована на макропорозном глицидилметакрилату, при чему је добијен имобилизат велике активности и повећане термостабилности и стабилности у органском растварачу у односу на растворни облик ензима. Степен добијене термостабилизације је био већи у односу на сличне студије имобилизације (на полианилину) описане у литератури и последица је оптимизације дијаметра пора на површини макропорозног глицидилметакрилата. С обзиром да је растворни ензим познат као термостабилан додатна стабилизација добијена у оквиру ове тезе добија посебно на значају.

Коришћењем познатих реакција са полисахаридима као што је перјодатна оксидација и редуктивна аминација успешно су синтетисани нови модификати пектина. Увођењем амино и фенолне групе уз задржавање присуства карбоксилне групе у молекулу пектина повећана је хидрофилност и растворљивост пектина у односу на сличне модификате катјонских полисахарида тирамином описане у литератури. Ове особине су обезбедиле олакшано гелирање пектина и у присуству калцијума и у присуству пероксидазе и јаче везивање имобилизованог ензима за полисахаридну мрежу тирамин-пектинског хидрогела. Захваљујући томе пероксидаза из соје је успешно имобилизована у микро-куглицама тирамин-пектина добијеним у реакцији емулзионе полимеризације, док је у сличним студијама у литератури и коришћењем нативног пектина принос имобилизације био веома мали. Добијени имобилизат ензима је имао повећану термостабилност и стабилност у органском растварачу. Степен стабилизације је био већи него у случају макропорозног глицидилметакрилата што се може објаснити вишеструким везивањем ензима за полисахаридну мрежу хидрогела преко новоуведених функционалних група у молекул пектина.

Добијени препарати имобилизованог ензима су тестирани у реакцијама уклањања фенола из синтетских отпадних вода. Реакција полимеризације је оптимизирана у погледу количине додатог ензима и брзине достављања водоник-пероксида у реакциони систем. Подешавање брзине достављања је рађено контролисањем концентрације глукозе и ензима глукоза оксидазе у реакционом

систему. Захваљујући томе смањена је инактивација пероксидазе у односу на сличне реакције описане у литератури где се целокупна количина водоник-пероксида додаје на почетку реакције.

## Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

### 1. Научни радови

#### 1.1. М21 - Радови објављени у водећим часописима међународног значаја

1.1.1. **Prokopijević M.**, Prodanović O., Spasojević D., Stojanović Ž., Radotić K., Prodanović R. (2014) Soybean hull peroxidase immobilization on macroporous glycidyl methacrylates with different surface characteristics. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Springer, Germany, Vol. 37, No. 5, p. 799-804. **DOI:** 10.1007/s00449-013-1050-z. **ISSN:** 1615-7591. (IF<sub>2014</sub>: 1.997, Engineering, Chemical 51/135)

1.1.2. **Prokopijević M.**, Prodanovic O., Spasojevic D., Kovacevic G., Polovic N., Radotić K., Prodanovic R. (2016) Tyramine-modified pectins via periodate oxidation for soybean hull peroxidase induced hydrogel formation and immobilization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer, Germany, Vol. 101, No. 6, p. 2281-2290. **DOI:** 10.1007/s00253-016-8002-x. **ISSN:** 0175-7598. (IF<sub>2015</sub>: 3.376, Biotechnology & Applied Microbiology 41/161)

### 2. Саопштења са научних скупова

#### М33 - Рад саопштен на скупу међународног значаја штампано у целини

2.1.1. **Prokopijević M.**, Prodanović O., Spasojević D., Prodanović R., Stojanović Ž., Radotić Hadži-Manić K., (2011) Optimizacija uslova za glutaraldehydnu imobilizaciju peroksidaze iz soje. Naučni skup sa međunarodnim učešćem Zaštita prirode u 21 vijeku, Septembar 20-23, Žabljak, Crna Gora, Proceedings Vol. 2, p. 697-700.

#### М34 - Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу

2.1.2. **Prokopijević M.**, Prodanović O., Spasojević D., Prodanović R., Stojanović Ž., Radotić Hadži-Manić K., (2011) Optimization of conditions for glutaraldehyde immobilization of soyabean peroxidase. Naučni skup sa međunarodnim

učešćem Zaštita prirode u 21 vijeku, Septembar 20-23, Žabljak, Crna Gora, Proceedings Vol. 2, p. 925.

- 2.1.3. **Prokopijević M.**, Prodanović O., Spasojević D., Stojanović Ž., Radotić K., Marinković E., Prodanović R. (2013) Different immobilization methods of soybean hull peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate copolymers. In: Book of Abstracts of the 4th Croatian Botanical Symposium with international participation, Split, Croatia, September 27-29, 2013, p 90.
- 2.1.4. **Prokopijević M.**, Prodanović O., Spasojević D., Stanković M., Stojanović Ž., Radotić K., Prodanović R. (2015) Characterization of soybean hull peroxidase immobilized on glycidyl methacrylate copolymers. In: Book of Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Conference on Plant Biology, Petnica, Serbia, June 17-20, 2015, p 17.

#### **M63 - Рад саопштен на скупу националног значаја штампан у целини**

- 2.1.5. **Prokopijević M.**, Prodanović O., Spasojević D., Stojanović Ž., Radotić Hadžimančić K., Prodanović R. (2012) Poređenje imobilizacije peroksidaze soje na različite glicidil metakrilat polimere. U: Knjizi radova 50. jubilarnog savetovanja Srpskog hemijskog društva, 14-15. juni 2012, Beograd, Srbija, str. 191-194.

### **Д. Закључак**

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације Милоша М. Прокопијевића, дипломираног биохемичара, под насловом „**Имобилизација пероксидазе из соје (*Glycine max*) на макропорозном глицидил-метакрилату и хемијски модификованом пектину**“ закључила да је кандидат успешно одговорио на све постављене задатке везане за развој нових препарата имобилизоване пероксидазе из соје. Оптимизацијом имобилизације у погледу површинских карактеристика коришћеног макропорозног кополимера, методе ковалентне имобилизације и количине додатог ензима добијен је препарат имобилизованог ензима на макропорозном кополимеру велике активности и побољшане термостабилности и стабилности у органском растварачу. Такође је добијен нови модификат пектина увођењем амино и фенолних група у полисахаридни ланац. Добијени модификовани пектин је у потпуности окарактерисан савременим спектроскопским методама. Захваљујући присуству и позитивног и негативног наелектрисања, као и фенолних група добијени су

модификати пектина повећане растворљивости у односу на нативан пектин који су могли да формирају хидрогелове и у присуству калцијума и у присуству пероксида и пероксидазе. Услед увођења неколико функционалних група формирани хидрогелови су се показали као погодни за имобилизацију ензима и његово дуготрајно задржавање унутар тирамин-пектинских микрокуглица. У оквиру тезе је такође оптимизирана и реакција уклањања фенола из вештачких отпадних вода добијеним препаратима имобилизоване пероксидазе контролисањем брзине достављања водоник пероксида у реакцију употребом реакције оксидације глукозе ензимом глукоза-оксидаза.

Резултати истраживања, проистекли из ове докторске дисертације, објављени су у два рада штампана у врхунским међународним часописима из категорије M21 у којима је кандидат први аутор.

Имајући у виду резултате до којих је кандидат дошао у својим истраживањима приказаним у докторату, као и њихов научни значај, Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета, Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију под наведеним насловом, кандидата Милоша Прокопијевића, прихвати и одобри њену одбрану.

У Београду, 06.07.2017.

#### **Комисија:**

Др Радивоје Продановић, ванредни професор,  
Хемијски факултет, Универзитет у Београду  
(ментор)

---

Др Марија Гавровић Јанкуловић, редовни  
професор, Хемијски факултет, Универзитет у  
Београду

---

Др Ксенија Радотић Хаци-Манић, научни  
саветник, Институт за мултидисциплинарна  
истраживања (ИМСИ), Универзитет у Београду

---