

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ  
ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

**ПРЕДМЕТ:** Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Невене Суруџић (рођ. Пантић), дипломираног хемичара, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 11. јануара 2024, одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Невене Суруџић (рођ. Пантић), дипломираног хемичара, мастер биохемичара под називом:

**„Уклањање фенола и текстилних боја из отпадних вода имобилизованим пероксидазама из рена (*Armoracia rusticana*) и гљиве беле трулежи (*Phanerochaete chrysosporium*)“**

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној дана 14. 1. 2021. године на захтев Хемијског факултета дало сагласност на предлог теме докторске дисертације.

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

**А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација Невене Суруџић написана је на 114 страна, А4 формата (фонт „Cambria“, величина 12, са проредом 1 и маргинама 2 cm) и садржи 72 слике и 9 табела. Дисертација је подељена на 7 целина: Увод (3), Теоријски део (48), Материјали и методе (9), Циљеви докторске дисертације (1), Резултати и дискусија (36), Закључак (3) и Литература (1). Поред наведеног, дисертација садржи и Насловне стране на српском и енглеском језику, страну са именима чланова комисије, Захвалницу (1), Сажетак на српском и енглеском језику (4), Листу скраћеница и акронима (1), Садржај (5), Биографију кандидата (1), Изјаву о ауторству (1), Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада (1) и Изјаву о коришћењу (1).

**Увод** садржи предмет и циљ истраживања ове докторске дисертације, као и осврт на значај и актуелност проблематике овог истраживања. На самом почетку истакнута је важност проналажења одговарајућих метода за елиминацију фенола и фенолних једињења из водених токова, која је повезана са њиховим изузетно великим степеном токсичности чак и у веома ниским концентрацијама. Наведене су доступне методе за

њихово уклањање, а посебан акценат је стављен управо на оне методе које обухватају примену биокатализатора, превасходно ензима изолованих из биљака и имобилизованих на различитим типовима носача (природни полимери, неоргански силикатни носачи или синтетски органски полимери).

**Теоријски део** је подељен на девет целина. У целини **Феноли и фенолни загађивачи животне средине** описане су особине фенолних једињења, приказане су методе за њихово добијање, као и утицај фенола на здравље, а наведене су и области у којима се ова једињења могу применити. Целине **Уклањање фенола и фенолних једињења** и **Методе за уклањање фенола** описују колико су ова једињења присутна у одговарајућим типовима отпадних вода и приказују физичке, хемијске, биолошке и ензимске методе које се могу применити за њихово уклањање. Откриће органских боја, њихова класификација, физичке и хемијске особине су представљене у целини **Органске боје**, док је у целинама **Уклањање органских боја** и **Методе за деградацију органских боја** истакнута важност развијања метода за елиминацију боја из отпадних водених токова. Поред тога, наведени су и описани сви до сада познати начини за деградацију органских боја. Целина **Пероксидазе за оксидацију фенола и деградацију синтетских боја** истиче пре свега предности коришћења ензима, на првом месту пероксидаза, у процесу уклањања боја. У овој целини су описани и механизми дејства наведених ензима при употреби у те сврхе. Структурне карактеристике, каталитички механизми, есеји за одређивање активности као и области примене пероксидаза из рена и гљиве беле трулежи приказане су у целини **Пероксидазе**. **Имобилизација ензима** је целина у којој су описани утицаји имобилизације на активности, стабилности и селективности ензима, као и различите методе које се могу применити за њихову имобилизацију. Наведени су и најчешће коришћени носачи за имобилизацију ензима, при чему је посебан акценат стављен на биополимере, превасходно на алгинат, његове особине, потенцијал модификације и распрострањену примену, а нарочито је истакнута могућност добијања хидрогелова и њихова примена. Синтетски органски полимери и неоргански носачи силикатне природе представљени су као потенцијални носачи за имобилизацију, а посебно је наглашена важност примене имобилизованих ензима у широком спектру области.

**Материјали и методе** садрже детаљан опис опреме, реагенаса и узорака, као и експерименталних метода и процедура коришћених у овој докторској дисертацији.

У поглављу **Циљеви докторске дисертације** истакнути су и подвучени најважнији циљеви ове дисертације.

**Резултати и дискусија** приказују резултате добијене током израде ове докторске дисертације, који су детаљно представљени, прокоментарисани и подељени у петанаест целина. У првој целини приказане су реакције модификације алгината, оксидацијом у присуству натријум-перјодата и редуктивном аминацијом тирамин-хидрохлоридом. Друга целина обухвата енкапсулацију пероксидазе из рена унутар тирамин-алгинатног хидрогела, док су у следећој целини оптимизовани услови за уклањање фенола из шаржног реактора, применом пероксидазе имобилизоване у модификованом алгинату.

Исти принцип имобилизације је примењен и за енкапсулацију ћелијских зидова са лигнин-пероксидазом у хидрогелу од модификованог алгината и описан у четвртој целини, док је у следећим целинама приказана деколоризација органских боја и поновна употреба ових имобилизата током деколоризације. У седмој целини је представљена синтеза и карактеризација макропорозних кополимера, док је у осмој описана имобилизација пероксидазе из рена на новосинтетисаним полимерима са различитом величином пора. Испитивање стабилности имобилизоване пероксидазе приказано је у деветој целини. Десета целина бави се кинетичким студијама пероксидазе имобилизоване на макропорозним кополимерима, док је у следећој целини представљена њена оперативна стабилност. У дванаестој целини описано је уклањање фенола из шаржног реактора пероксидазом имобилизованом на макропорозним кополимерима. Иmobилизација истог ензима на неорганском носачу – сепиолиту приказана је у целини тринаест. Последње две целине баве се испитивањима стабилности пероксидазе имобилизоване на сепиолиту.

У поглављу **Закључак** приказан је кратак преглед најважнијих резултата ове дисертације.

Поглавље **Литература** садржи списак радова са релевантним информацијама везаним за све сегменте истраживања приказаних у овој докторској дисертацији.

## **Б. Кратак приказ резултата**

Током израде ове докторске дисертације оптимизовани су услови за уклањање фенола и деградацију текстилних боја имобилизованом пероксидазом из рена и ћелијским зидовима са лигнин-пероксидазом. За имобилизацију ензима су као носачи коришћени модификован алгинат, који је оксидован натријум-перјодатом и редуктивно-аминован тирамин-хидрохлоридом; макропорозни кополимери синтетисани методом дисперзионе полимеризације са различитом величином пора, као и неоргански глиненосач – сепиолит.

За енкапсулацију пероксидазе из рена применом купловане емулзионо-полимеризационе реакције коришћени су алгинати, оксидовани у различитом степену натријум-перјодатом (2,5, 5, 10, 15 и 20 мол%) и модификовани тирамином у присуству натријум-цијаноборхидрида као редукционог средства. Заступљеност фенолних група у полимерном ланцу је потврђена *UV-VIS* и *FTIR* спектроскопијом. Преко ових група је остварено умрежавање и формирање хидрогелова. Постепено отпуштање водоник-пероксида из глукозе употребом глукоза-оксидазе подстиче међусобно удруживање тираминских остатака, и формирање мреже унутар које је заробљен ензим. Да ефикасност имобилизације пероксидазе зависи од степена оксидације тирамин-алгината перјодатом, показује повећање специфичне активности енкапсулираног ензима са порастом процента оксидованих гликозилних јединица дуж полимерног ланца.

Параметри процеса уклањања фенола, као што су концентрација пероксидазе коришћене за енкапсулацију, као и механизам доставе водоник-пероксида у реакциони систем, су оптимизовани са циљем повећања ефикасности и побољшања континуалне примене.

Највећа ефикасност уклањања фенола је постигнута када је за енкапсулацију употребљен ензим у концентрацији од 6,98 U/mL. Присуство водоник-пероксида је неопходно за одвијање реакције оксидације фенола, а обезбеђено је на два начина. Први подразумева директно додавање овог реагенса у реакциони систем, док други обухвата његово унутрашње добијање оксидацијом глукозе у присуству глукоза-оксидазе. Коришћењем система за унутрашње настајање водоник-пероксида у реакционој смеси постигнута је ефикасност уклањања фенола од 96%, док је знатно мање фенола уклоњено директним додавањем пероксида (42%). Уклањање фенола из воде у временском периоду од шест сати је остварено применом ензима заробљеног у алгинатне гелове, добијене од модификованог алгината оксидованог 15 односно 20 мол%. Пероксидаза имобилизована унутар тирамин-алгинатног хидрогела оксидованог у већем проценту показала је повећану способност оксидације фенола.

Како би се обезбедила што већа ефикасности уклањања фенола из шаржног реактора применом енкапсулираног ензима, испитиване су различите концентрације глукозе и глукоза-оксидазе, у циљу проналажења најбоље релације између њих која би обезбедила адекватну доставу водоник-пероксида у реакциони систем, а самим тим и већи степен оксидације фенола. Истраживања представљена у овој докторској дисертацији су показала да се ефикасност уклањања фенола повећава када се за директно ослобађање водоник-пероксида у реакционој смеси користи мања концентрација глукоза-оксидазе (0,187 U/mL), и са повећањем концентрације глукозе од 2 до 4 mmol/L. Током континуалне примене пероксидазе имобилизоване унутар 20 мол% оксидованих тирамин-алгинатних микро-куглица из система је у првом циклусу уклоњена велика количина фенолног једињења (чак 96%). Њена способност у наредним циклусима оксидације опада. Висок степен ефикасности уклањања фенола током 4 узастопна циклуса је остварен применом пероксидазе имобилизоване унутар алгинатног гела добијеног од 15 мол% оксидованог алгината.

Ћелијски зидови са лигнин-пероксидазом су имобилизовани унутар калцијум-алгинатног хидрогела и употребљени у реакцијама деградације текстилних боја (*Evans Blue* и *Amido Black 10B*). Најбољи резултати су постигнути када је као носач коришћен 2,5 мол% оксидовани тирамински дериват алгината, који је показао способност оксидације 86% *Evans Blue* и 84% *Amido Black 10B* боје након 48 сати инкубације. Енкапсулирани ћелијски зидови са лигнин-пероксидазом су тестирано за деградацију наведених боја током 12 циклуса поновне употребе и показали су одличне резултате. Након тог периода из реакционе смеше је уклоњено 69% *Evans Blue* боје, док је тај проценат за *Amido Black 10B* боју био нешто нижи (34%).

Методом дисперзионе полимеризације, којом се добијају честице мањег пречника од око 2  $\mu\text{m}$ , синтетисани су макропорозни кополимери са величином пора од 150 до 310 nm. Тестиране су две методе за имобилизацију пероксидазе из рена на кополимерима накнадно модификованим етилен-диамином: глутаралдехидна и перјодатна метода. Прва метода подразумева везивање ензима за површину носача посредством глутаралдехида, док друга обухвата оксидацију молекула ензима натријум-перјодатом и његово даље ковалентно везивање за кополимер. Откривено је да постоји повезаност

између величине пора макропорозног кополимера, коришћене методе за имобилизацију и специфичне активности имобилизованог ензима. Систем који се састоји од кополимера са величином пора од 234 nm на ком је перјодатном методом ковалентно везана пероксидаза, је показао најбоље резултате у погледу активности имобилизованог ензима, његове стабилности на повишеним температурама, у органском растварачу и на различитим рН вредностима. Након 5 циклуса континуалне примене за оксидацију супстрата пирогалола ензим имобилизован на овом кополимеру је задржао 80% почетне активности. Модификацијом услова за уклањање фенола из шаржног реактора претходно оптимизованих за алгинатни носач, односно смањењем трајања једног циклуса и испирањем макропорозног носача (величина пора од 234 nm) са имобилизованом пероксидазом етанолом између два циклуса, остварена су 4 узастопна циклуса поновне употребе при чему је у последњем циклусу из реакционе смеше уклоњено око 26% фенола .

За адсорпцију како нативне, тако и пероксидазе оксидоване натријум-перјодатом, као носач је искоришћен и сепиолит, минерал глиненог порекла и силикатне структуре. Када се на сепиолит перјодатном методом веже 15 mg/g оксидованог ензима, остварује се највећа активност, као и побољшана стабилност на повишеним температурама и на различитим рН вредностима. Континуалном применом овог система током 4 циклуса оксидације пирогалола имобилизовани ензим је задржао 42% активности.

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

Феноли и фенолна једињења спадају у групу најчешћих загађивача животне средине, пре свега водених екосистема. Из тог разлога су данас многобројна истраживања усмерена управо ка развоју метода за њихово уклањање. Новије студије се баве употребом нано-честица за оксидацију неких група фенолних једињења (2-хлорофенола) и њихову детоксификацију [1,2], а добијени резултати су значајно бољи у поређењу са конвенционалним приступом за третирање отпадних вода. У ове сврхе примену су пронашли и многобројни системи имобилизованих ензима, који захваљујући високој специфичности, селективности и ефикасности ензима у различитим условима (у широком температурном опсегу, као и при другачијим рН вредностима) остварују јако добре резултате [3]. У оквиру ове докторске дисертације оптимизовани су параметри за уклањање фенола из шаржног реактора коришћењем до сада за то најчешће примењиваног ензима – пероксидазе из рена, имобилизоване на различитим типовима носача (модификовани алгинат и макропорозни кополимери различите величине пора). Енкапсулација овог ензима унутар алгинатног хидрогела је остварена помоћу ензимске емулзионо-полимеризационе реакције. За разлику од најчешће коришћеног умрежавања природних полимерних једињења различитим металним јонима, ковалентним умрежавањем тирамином модификованог алгината преко фенолних група обезбеђује се истовремено формирање хидрогела и заробљавање ензима [4]. Модификацијом полимера и применом купловане реакције оксидације глукозе у присуству ензима глукоза-оксидазе уз настајање водоник-пероксида смањена је, пре свега, могућност дифузије ензима са носача, као и вероватноћа инактивације ензима узрокована вишком супстрата. Метод за уклањање фенола је оптимизован подешавањем параметара као што

су концентрације пероксидазе и водоник-пероксида, а потом и начина за доставу водоник-пероксида у реакциони систем. Наше истраживање је у корелацији са претходно објављеним студијама, које су показале да се већа ефикасност уклањања фенолних једињења постиже имобилизацијом веће концентрације ензима [5]. За одвијање реакције оксидације фенолних једињења неопходно је присуство водоник-пероксида, реагенса који оксидује гвожђе унутар активног места ензима, што даље омогућава оксидацију фенолних једињења. Многбројне студије су показале да се са повећањем концентрације пероксида приликом третирања отпадних вода повећава и ефикасност целокупног процеса, али да се истовремено као негативан ефекат може јавити и инактивација саме пероксидазе [6,7]. Како би се елиминисала могућност ове појаве, за добијање водоник-пероксида директно у реакционој смеси за уклањање фенола искоришћена је претходно поменута реакција оксидације глукозе глукоза-оксидазом. У циљу постизања максималне ефикасности испитиване су различите концентрације и једне и друге компоненте реакционог система, при чему су добијени резултати показали да се боља ефикасност постиже при примени мање концентрације глукоза-оксидазе и веће концентрације глукозе, као и да је овај начин увођења водоник-пероксида напреднији у поређењу са његовим директним додавањем у систем. Стварањем водоник-пероксида директно у шаржном реактору за уклањање фенола, обезбеђено је да се у једном тренутку у систему налази мања количина овог реагенса, чиме се директно утиче на смањење вероватноће губитка активности имобилизоване пероксидазе. Смањена ефикасност уклањања фенола при већим концентрацијама глукоза-оксидазе може се објаснити акумулацијом глуконо-лактона и пероксида, што доводи до инхибиције имобилизоване пероксидазе [8]. *Alemzadeh* и *Nejati* су у свом истраживању остварили 5 циклуса поновне употребе калцијум-алгинатних микро-куглица са имобилизованом пероксидазом током којих је постигнута ефикасност уклањања од 50% [4]. У овој дисертацији је са енкапсулираном пероксидазом унутар модификованог алгината остварена ефикасност уклањања фенола од 61% након 4 узастопна циклуса примене у оксидацији фенола.

Резултати ранијих испитивања су показали да су макропорозни кополимери састављени од глицидил метакрилата (*GMA*) и етилен гликол диметакрилата (*EGDMA*), синтетисани методом суспензионе полимеризације, веома погодни носачи за имобилизацију ензима [9]. У овом истраживању нови макропорозни кополимери базирани на *GMA* и *EGDMA* мономерима, величине честица од око 2  $\mu\text{m}$  у пречнику, су добијени дисперзионом полимеризацијом. Испитано је дејство смањења величине честица на потенцијал имобилизације ензима на датом носачу, као и утицај различите величине пора синтетисаног кополимера на активност и стабилност имобилизоване пероксидазе из рена. Примењене су две методе имобилизације: глутаралдехидна и перјодатна. Први начин је често коришћен за имобилизације многих ензима и подразумева везивање за носач преко амино група присутних на површини молекула протеина, а посредством умреживача – глутаралдехида [10]. У последње време се у истраживањима често користи и перјодатни метод, који се односи на ковалентно везивање ензима, претходно подвргнутог оксидацији натријум-перјодатом, за матриксе са амино групама [10,11]. Уочена је да се перјодатним методом остварује већа ефикасност, која се може објаснити

очувањем структуре активног места приликом оксидације ензима. Слични резултати добијени су и за липазе [10]. Prampago и сарадници су повећану ефикасност приписали успостављању повољнијих интеракција између ензима и носача (*Eupergit C*) када се за имобилизацију користи перјодатни метод [12]. У литератури је истакнуто да пораст величине пора неког носача узрокује повећану специфичну активност имобилизованог ензима [13]. Исто је потврђено и у овој студији – веће вредности специфичне активности имобилизоване пероксидазе добијене су када је ензим имобилизован на макропорозне кополимере модификоване етилен-диамином са већим порамма величине од 234 и 297 nm. Вишеструко везивање ензима за носач обезбеђује формирање стабилнијих 3D структура, чиме је остварена повећана температурна стабилност имобилизованог ензима. Побољшана стабилности имобилизоване пероксидазе из рена у растварачима као што су метанол, ацетон и ацетонитрил приказана је у литератури [14], док је ово истраживање потврдило да се имобилизацијом пероксидазе на синтетисаном макропорозном кополимеру остварује повећана стабилност и у 80% диоксану. Као што су приметили Alshawafi и сарадници [15], имобилизацијом ензима се смањује доступност ензима супстрату, што је у директној вези са његовим афинитетом према поменутој молекули. За разлику од осталих истраживања, у овом је установљена побољшана стабилност ензима и након 5 циклуса поновне употребе пероксидазе имобилизоване на новосинтетисаним макропорозним кополимерима за оксидацију пирогалола [16]. Применом новог система имобилизације ензима за уклањање фенола из шаржног реактора постигнута је адекватна ефикасност након 4 циклуса континуалне примене. Добијени резултати су у корелацији са претходно оствареним за пероксидазу имобилизовану на наночестицама [17].

За адсорпцију пероксидазе из рена као носач је тестиран и неоргански глинен минерал – сепиолит. Испитан је утицај количине додатог ензима (растворног и оксидованог натријум-перјодатом) на његову специфичну активност. Са повећањем количине имобилизованог ензима на површини носача до 15 mg/g повећава се и његова специфична активност. Даљи пораст количине ензима доводи до смањења вредности специфичне активности, што су *Mortazavi* и сарадници приписали узајамним интеракцијама између молекула ензима [18]. Студије стабилности – температурна, оперативна стабилност и стабилност на различитим рН вредностима су показале да имобилизовани ензим претходно оксидован перјодатом има боље особине него неоксидовани облик ензима. Континуалном применом перјодатно оксидоване пероксидазе адсорбоване на сепиолиту за оксидацију пирогалола потврђен је тренд који је уочен и у другим истраживањима – повећање броја циклуса води смањењу ефикасности и активности. Овакво понашање је установљено и код липазе имобилизоване на истом носачу, а може се објаснити било инхибицијом ензима или акумулацијом воде на површини [18].

#### Литература:

- [1] M.Z. Ahamd, S. Ehtisham-Ul-haque, N. Nisar, K. Qureshi, A. Ghaffar, M. Abbas, J. Nisar, M. Iqbal, Detoxification of photo-catalytically treated 2-chlorophenol: Optimization through response surface methodology, *Water Sci. Technol.* 76 (2017)

- 323–336. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.152>.
- [2] A. Shafique, I.A. Bhatti, A. Ashar, M. Mohsin, S.A. Ahmad, J. Nisar, T. Javed, M. Iqbal, FeVO<sub>4</sub> nanoparticles synthesis, characterization and photocatalytic activity evaluation for the degradation of 2-chlorophenol, *Desalin. Water Treat.* 187 (2020) 399–409. <https://doi.org/10.5004/dwt.2020.25584>.
- [3] T. Chiong, J. Lau, E. Khor, M. Danquah, Enzymatic approach to phenol removal from wastewater using peroxidases, *OA Biotechnol.* 3 (2016).
- [4] I. Alemzadeh, S. Nejati, Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 1082–1086. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.026>.
- [5] M. Monier, D.M. Ayad, Y. Wei, A.A. Sarhan, Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads, *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2010) 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.12.018>.
- [6] K. Kurnik, K. Treder, M. Skorupa-Klaput, A. Tretyn, J. Tyburski, Removal of Phenol from Synthetic and Industrial Wastewater by Potato Pulp Peroxidases, *Water. Air. Soil Pollut.* 226 (2015) 254. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2517-0>.
- [7] S. Wang, H. Fang, X. Yi, Z. Xu, X. Xie, Q. Tang, M. Ou, X. Xu, Oxidative removal of phenol by HRP-immobilized beads and its environmental toxicology assessment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130 (2016) 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.022>.
- [8] Y. Zhang, S. Tsitkov, H. Hess, Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase-horseradish peroxidase cascade, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms13982>.
- [9] M. Prokopijevic, O. Prodanovic, D. Spasojevic, Z. Stojanovic, K. Radotic, R. Prodanovic, Soybean hull peroxidase immobilization on macroporous glycidyl methacrylates with different surface characteristics, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37 (2014) 799–804. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1050-z>.
- [10] Z. Knezevic, N. Milosavic, D. Bezbradica, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, *Biochem. Eng. J.* 30 (2006) 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.009>.
- [11] N. Milosavić, R. Prodanović, S. Jovanović, Z. Vujčić, Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA), *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1422–1426. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.018>.



- [12] L. Pramparo, F. Stüber, J. Font, A. Fortuny, A. Fabregat, C. Bengoa, Immobilisation of horseradish peroxidase on Eupergit®C for the enzymatic elimination of phenol, *J. Hazard. Mater.* 177 (2010) 990–1000. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.017>.
- [13] L. Ferreira, M.A. Ramos, J.S. Dordick, M.H. Gil, Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg), *J. Mol. Catal. B Enzym.* 21 (2003) 189–199. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00223-0).
- [14] Z. Temoçin, M. Yiğitoğlu, Studies on the activity and stability of immobilized horseradish peroxidase on poly(ethylene terephthalate) grafted acrylamide fiber, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32 (2009) 467–474. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0266-9>.
- [15] W.M. Alshawafi, M. Aldhahri, Y.Q. Almulaiky, N. Salah, S.S. Moselhy, I.H. Ibrahim, R.M. El-Shishtawy, S.A. Mohamed, Immobilization of horseradish peroxidase on PMMA nanofibers incorporated with nanodiamond, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) S973–S981. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1522321>.
- [16] H. Qiu, L. Lu, X. Huang, Z. Zhang, Y. Qu, Immobilization of horseradish peroxidase on nanoporous copper and its potential applications, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 9415–9420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.097>.
- [17] Z. Temoçin, M. İnal, M. Gökgöz, M. Yiğitoğlu, Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun poly(vinyl alcohol)–polyacrylamide blend nanofiber membrane and its use in the conversion of phenol, *Polym. Bull.* 75 (2018) 1843–1865. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2129-5>.
- [18] S. Mortazavi, H. Aghaei, Make proper surfaces for immobilization of enzymes: Immobilization of lipase and  $\alpha$ -amylase on modified Na-sepiolite, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.103>.

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

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су два научна рада публикова у врхунским међународним часописима (категирија **M21**), три саопштења са међународних скупова штампана у целости (категирија **M33**), као и једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (**M34**).

1. Радови публиковани у врхунском међународном часопису (**M21**)

**Pantić N.**, Prodanović R., Ilić Đurđić K., Polović N., Spasojević M., Prodanović O. (2021) Optimization of Phenol Removal with Horseradish Peroxidase Encapsulated within Tyramine-Alginate Micro-Beads, *Environmental Technology and Innovation*, 21, 101211.

DOI:<https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101211>

ИФ: 7,758 (2021)

Поље истраживања: Наука о животној средини 42/279 (2021) ISSN: 2352-1864

**Pantić N.**, Spasojević M., Stojanović Ž., Veljović Đ., Krstić J., Balaž A.M., Prodanović R., Prodanović O. (2022) Immobilization of Horseradish Peroxidase on Macroporous Glycidyl - Based Copolymers with Different Surface Characteristics for the Removal of Phenol, *Journal of Polymers and the Environment*, 30, 3005–3020.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02364-3>

ИФ: 4,705 (2021)

Поље истраживања: Наука о полимерима 20/90 (2021) ISSN: 1566-2543

## 2. Саопштења са међународних скупова штампана у целости (M33)

**Pantić N.**, Popović N., Prokopijević M., Spasojević D., Prodanović R., Đikanović D., Prodanović O. Optimization of horseradish peroxidase encapsulation within tyramine-alginate for phenol removal. 27<sup>th</sup> International Conference Ecological Truth and Environmental Research, 18-21 June 2019, Hotel Jezero, Bor Lake, Serbia, 220-223.

**Pantić N.**, Spasojević M., Prokopijević M., Spasojević D., Balaž A.M., Prodanović R., Prodanović O. (2022) Covalent immobilization of horseradish peroxidase on novel macroporous poly(GMA-co-EGDMA) for phenol removal. 29<sup>th</sup> International Conference Ecological Truth and Environmental Research, 21–24 June 2022, Hotel Sunce, Sokobanja, Serbia, 354–359.

**Surudžić N.**, Spasojević D., Stanković M., Spasojević M., Elgahwash R.G.A., Prodanović R., Prodanović O. (2023) Horseradish peroxidase immobilization within micro-beads of oxidized tyramine-alginate for phenol removal from wastewater. 30<sup>th</sup> International Conference Ecological Truth and Environmental Research, 20–23 June 2023, Serbia, 267–271.

## 3. Сапштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

**Pantić N.**, Popović N., Prokopijević M., Spasojević D., Prodanović R., Radotić K., Prodanović O. (2018) Optimization of reaction conditions for phenol removal in batch reactor with horseradish peroxidase immobilized within tyramine-alginate micro-beads. 3rd International Conference on Plant Biology (22nd SPPS Meeting), 9-12 June, Belgrade, Serbia, p. 157.

Поред наведених публикација и саопштења који су проистекли из ове докторске дисертације, кандидат је коаутор на једном раду публикованом у истакнутом међународном часопису (M22), једном раду публикованом у међународном часопису без импакт фактора (M24), као и на 6 саопштења са међународних скупова штампаних у целости (M33), једном саопштењу са међународног скупа штампаног у изводу (M34) и на једном саопштењу са скупа од националног значаја штампаног у изводу (M64).

## Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације проверена је на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Помоћу програма *iThenticate*, утврђено је да количина подударача текста износи 7%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена/звања, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата истраживања кандидаткиње који су проистекли из ове докторске дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак за њену одбрану може наставити.

## Ђ. Закључак

На основу свега изложеног, Комисија закључује да је у поднетој докторској дисертацији под називом „Уклањање фенола и текстилних боја из отпадних вода имобилизованим пероксидазама из рена (*Armoracia rusticana*) и гљиве беле трулежи (*Phanerochaete chrysosporium*)“ кандидаткиња Невена М. Суруџић (рођ. Пантић) успешно одговорила на све постављене циљеве који се тичу развијања и оптимизовања метода за уклањање фенола и текстилних боја имобилизованим пероксидазама из рена и ћелијским зидовима са лигнин-пероксидазом. За имобилизацију су као носачи коришћени оксидовани алгинат модификован тирамином, макропорозни кополимери са порама различите величине, као и неоргански глинен минерал – сепиолит. Пероксидаза из рена је енкапсулирана унутар тирамин-алгинатних микро-куглица применом емулзионо-полимеризационе реакције. За уклањање фенола из шаржног реактора употребљена је имобилизована HRP, а реакциони услови су оптимизовани са циљем постизања високог степена ефикасности и побољшане континуалне примене. Оксидацијом глукозе у присуству глукоза-оксидазе директно је у реакционој смеси добијен водоник-пероксид, чиме је значајно повећана ефикасност уклањања фенола. Деградација текстилних боја је остварена и применом ћелијских зидова са лигнин-пероксидазом заробљених у калцијум-алгинатном хидрогелу. Енкапсулирани ћелијски зидови су инкубирани у растворима боја *Evans Blue* и *Amido Black 10B* током 48 h и уочено је постепено повећање процента деградације са периодом инкубације. Континуалном применом ћелијских зидова са лигнин-пероксидазом могуће је остварити ефикасну деградацију током 12 узастопних циклуса. Дисперзионом полимеризацијом су синтетисани макропорозни кополимери величине честица од приближно 2  $\mu\text{m}$  састављених од глицидил метакрилата и етилен гликол диметакрилата са порама величине од 150 до 310 nm. За имобилизацију пероксидазе из рена на овим полимерима искоришћене су глутаралдехидна и перјодатна метода. Уочено је повећање активности и стабилности (температурна, на различитим рН вредностима и у органском растварачу) имобилизованог ензима, као и потенцијал примене у оксидацији фенола током 5 циклуса поновне употребе. За адсорпцију пероксидазе је као носач примењен и сепиолит, а уочена је повећана стабилност и активност адсорбоване перјодатом оксидоване пероксидазе у поређењу са нативном. Комисија сматра да резултати приказани у оквиру ове докторске дисертације кандидаткиње Невене М. Суруџић представљају оригиналан и значајан научни допринос области биохемијских наука.

Резултати научно-истраживачког рада кандидаткиње постигнути у оквиру ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада, оба у врхунским међународним часописима (категорије **M21**). Поред тога, резултати су презентовани на научним скуповима међународног значаја штампаних у целисти (категорије **M33**) и у изводу (категорије **M34**).

На основу свега наведеног, а у складу са Законом о високом образовању и Статутом Универзитета у Београду – Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета да поднету докторску дисертацију **Невене М. Суруџић** (рођ. Пантић), дипломираног хемичара, мастер биохемичара, под насловом „Уклањање фенола и текстилних боја из отпадних вода имобилизованим пероксидазама из рена (*Armoracia rusticana*) и гљиве беле трулежи (*Phanerochaete chrysosporium*)“ прихвати и одобри за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду,

23. 2. 2024.

**Комисија:**

---

др Радивоје Продановић, редовни професор  
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

---

др Марија Гавровић Јанкуловић, редовни професор  
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

---

др Милица Спасојевић Савковић, виши научни сарадник  
Универзитет у Београду – Иновациони центар Хемијског факултета

---

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

---

др Наташа Божић, научни саветник  
Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију