

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: Referat o urađenoj doktorskoj disertaciji kandidata Mr. Omar Ali Saied Moftah

Odlukom br. 30/128 od 26.05.2014. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata **Mr. Omar Ali Saied Moftah**, pod naslovom

**„Proizvodnja proteaza i lipaza fermentacijom sporednih proizvoda i otpadnih tokova
industrije maslinovog ulja“
("Protease and lipase production by fermentation of byproducts and wastes from the olive oil
industry")**

Posle pregleda dostavljene Disertacije i drugih pratećih materijala i razgovora sa Kandidatom **Mr. Omar Ali Saied Moftah**, Komisija je sačinila sledeći

R E F E R A T

1. UVOD

1.1. Hronologija odobravanja i izrade disertacije

Rešenjem broj (rešenje br 06-613-283/3-10) od 2010. godine doneto je Rešenje rektora Univerziteta u Beogradu kojim se Omaru Ali Said Moftah priznaje strana visokoškolska isprava stečena u inostranstvu, čijim priznavanje stiče pravo na nastavak obrazovanja na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu-prijava doktorske disertacije.

27.09.2013. – Kandidat Mr. Omar Ali Saied Moftah predložio je temu doktorske disertacije pod naslovom „Proizvodnja proteaza i lipaza fermentacijom sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije maslinovog ulja“, a Nastavno-naučno veće Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu usvojilo je Komisiju za ocenu naučne zasnovanosti predložene teme (odluka od 21.11.2013. godine).

03.03.2014.– Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta, na osnovu podnetog izveštaja Komisije, doneta je Odluka o prihvatanju predloga teme doktorske disertacije Omara Ali Saied Moftah pod nazivom „Proizvodnja proteaza i lipaza fermentacijom sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije maslinovog ulja“ i za mentora ove doktorske disertacije imenovana je dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor TMF-a.

31.03.2014.– Na sednici Veća naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu data je saglasnost na predlog teme doktorske disertacije Mr. Omara Ali Saied Moftah pod naslovom „Proizvodnja proteaza i lipaza fermentacijom sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije maslinovog ulja“.

22.05.2014.– Na sednici Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta doneta je Odluka o imenovanju Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije Omara Ali Saied Moftah pod naslovom „Proizvodnja proteaza i lipaza fermentacijom sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije maslinovog ulja“ (odluka br, 30/128 od 26.05.2014.).

1.2. Naučna oblast disertacije

Istraživanja u okviru ove disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo (uža naučna oblast Biotehnologija i biohemijsko inženjerstvo) za koju je matična ustanova Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu. Za mentora je izabrana dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor TMF-a, koja je na osnovu objavljenih publikacija i iskustva kompetentna da rukovodi izradom ove doktorske disertacije. Prema SCOPUSU mentor je publikovao 65 radova u časopisima sa SCI liste, koji su citirani 670 puta (522 bez autocitata i citata koautora), vrednost *h* indeksa je 13. Rukovodila je i izradom dve odbranjene doktorske disertacije.

1.3. Biografski podaci o kandidatu

Mr. Omar Ali Saied Moftah je rođen 11.02.1970 u Tripoliju, gde je završio osnovnu (76/77 – 81/82), pripremnu (82/83 – 84/8) i srednju školu (85/86 – 87/88). Školske 88/89 god. upisao se na studije na „Faculty of Technology and Engineering Sciences“, Univerzitet u Tripoliju, i diplomirao iz oblasti Tehnologije hrane 1992. godine sa prosečnom ocenom 80,96%.

Školske 98/99. god. upisuje se na magistarske studije na Al-Fatah Univerzitetu, Tripoli, koje završava 2003. godine (prosečna ocena 3,43). Magistarski rad pod naslovom "*Estimated daily intake of lead and cadmium in Libyan Jamahyria*" odbranio je maja 28.07.2003. godine i stekao diplomu magistra nauka, koja je priznata od strane Univerziteta u Beogradu (rešenje br 06-613-283/3-10). Školske 2009/2010. god. upisuje se na doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Bio je zaposlen kao asistent na Aljabl Algarbi Univerzitetu u Libiji u periodu od 2003-2009. god. Čita, piše i govori engleski jezik.

2. OPIS DISERTACIJE

2.1. Sadržaj disertacije

Doktorska disertacija Mr. Omara Ali Saied Moftah napisana je na 190 strana, sa ukupno 9 poglavlja, 50 grafičkih prikaza, 9 tabela i 411 literaturnih navoda. Doktorska disertacija sadrži sledeća poglavlja: Uvod, Fermentacija na čvrstim podlogama, Mikrobiološka proizvodnja lipaza, Mikrobiološka proizvodnja proteaza, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura. Pored toga, Disertacija sadrži izvode na srpskom i engleskom jeziku i prilog.

2.2. Kratak prikaz pojedinačnih poglavlja

U **uvodnom poglavlju** data su osnovna razmatranja o značaju razvoja novih biotehnoloških procesa na obnovljivim sirovinama kao i značaju iskorišćenja nusproizvoda ili otpada prehrambene industrije i poljoprivrede. Naročito je istaknuta potreba za iskorišćenjem otpada iz uljne industrije jer je poznato je da je industrija maslina i maslinovog ulja od velikog značaja za mediteranske zemlje. U toku proizvodnje ulja generišu se velike količine tečnog i čvrstog otpada. Po nekim podacima, preradom 1 tone svežih maslina dobija se 210-215 kg maslinovog ulja, 490-550 kg uljane pogače (čvrsti otpad) i 1-1,65 m³ otpadne vode iz mlina (tečni otpad). Prikazane su osnovne prednosti uljane pogače i otpadne vode iz industrije ulja kao sirovina za proizvodnju enzima kao što su relativno visok sadržaj nutritivno vrednih supstanci uključujući jednostavne i kompleksne ugljene hidrate, proteine, masti i ulja koji mogu poslužiti kao dobar izvor azota, ali i induktor biosinteze lipaza i/ili proteaza. Predstavljeno je trenutno tržišno i industrijsko stanje u ovoj oblasti. Na kraju poglavlja dati su ciljevi rada sa planom istraživanja.

U **Teorijskom delu** dati su osnovni principi tehnoloških procesa pri kultivaciji različitih mikroorganizama na otpadnim čvrstim i tečnim hranljivim podlogama, istaknute su njihove prednosti i nedostaci na konkretnim primerima. Detaljno je dat pregled proizvoda, naročito enzima, koji se mogu dobiti primenom tradicionalnih i razvojem novih biotehnoloških postupaka na obnovljivim sirovinama i čvrstom/tečnom poljoprivrednom otpadu ali i otpadu iz drugih industrija. Posebna pažnja u teorijskom delu je usmerena na fermentaciju na čvrstom otpadu. Ovakav vid fermentacije je jednostavan u pogledu procesne opreme kao i kontrole parametara procesa, ekonomski je opravdan i dobijaju se veći prinosi u poređenju sa fermentacijom u tečnoj podlozi, naročito kada su proizvodni mikroorganizmi plesni. U trećem i četvrtom poglavlju detaljno su opisani enzimi čija je proizvodnja predmet rada disertacije, i to mikrobne lipaze i proteaze. Opisana su osnovna svojstva ovih enzima koja se razlikuju kada su u pitanju različiti mikroorganizmi koji ih sintetišu, uključujući specifičnost prema supstratu, strukturu enzima i mehanizam delovanja. Izložene su i oblasti njihove industrijske primene pri čemu je naglašeno da je oblast primene određena svojstvima enzima. Zbog toga je veoma važno izvršiti karakterizaciju biosintetisanih lipaza i proteaza kada se koriste novi mikroorganizmi izolovani iz prirodnih staništa. Dat je detaljniji pregled literature koji opisuje trenutno stanje u oblasti proizvodnje lipaza i proteaza specifičnih svojstava na obnovljivim i otpadnim sirovinama pomoću različitih vrsta.

Eksperimentalni deo se sastoji od dva potpoglavlja: Materijali i Metode. U prvom potpoglavlju navedeni su svi materijali koji su korišćeni u istraživanjima, dok su u drugom date metode i uslovi koji su korišćeni u eksperimentalnom radu. Prvo su opisane metode za određivanje hemijskog sastava supstrata koji su korišćeni u radu i to uljane pogače, koja se dobija nakon ekstrakcije maslinovog ulja, i otpadne vode iz mlina. Opisane su metoda po Soksletu (Sohxlet) za određivanje sadržaja masti i ulja, metoda po Kjeldalu (Kjeldahl) za određivanje sadržaja proteina, metoda Karl Fišer-ove titracije za određivanje sadržaja vlage i aktivnosti vode u čvrstom supstratu, metoda po Folin-Ciocalteu za određivanje sadržaja ukupnih polifenola, dinitrosalicilna (DNS) metoda za određivanje sadržaja redukujućih šećera i druge. Isto tako, opisane su metode za grubu ocenu lipolitičke i proteolitičke aktivnosti različitih mikrobni vrsta u cilju primarne selekcije proizvodnih mikroorganizama i odmah, zatim, uslovi i metode za izolovanje mikrobni vrsta koje proizvode željene enzime tehnikom uzgajanja na selektivnim podlogama. Navedeni su i standardni mikrobiološki testovi i procedure po kojima je izvršena identifikacija izolata mikroorganizama, koji su pokazali dobru produktivnost. Dalje su opisani procesni parametri i podloge koje su korišćene u radu da bi se povećala sposobnost proizvodnog mikroorganizma da sintetizuje i produkuje određene lipaze i/ili proteaze. Opisane su metode za kvantitativno određivanje lipolitičke i proteolitičke aktivnosti, kao i procedure za utvrđivanje pH i temperaturnog profila proizvedenih enzima. Velika pažnja u radu je posvećena ispitivanju uticaja različitih pretretmana supstrata kao što su alkalni pretretman, tretman ultrazvukom visokog intenziteta i drugi na mikrobni rast i biosintezu enzima, pa su opisani i načini izvođenja pretretmana u eksperimentalnom delu, kao i metode za utvrđivanje ćelijskog rasta na osnovu optičke gustine i/ili brojanjem ćelija pod mikroskopom.

Poglavlje **Rezultati i diskusija** obuhvata prikaz rezultata dobijenih u eksperimentalnom radu, njihovu analizu i diskusiju uključujući i kritička poređenja sa rezultatima dobijenim iz literature u različitim ili sličnim sistemima. Rezultati i diskusija se sastoje od 9 potpoglavlja i to: 1) Hemijski sastav uljane pogače; 2) Hemijski sastav otpadne vode iz mlina; 3) Proizvodnja lipaza i proteaza pomoću *Candida utilis* fermentacijom na uljanoj pogači; 4) Proizvodnja lipaza i proteaza pomoću *Candida utilis* iz otpadne vode submerznim postupkom; 5) Proizvodnja lipaza i proteaza pomoću *Yarrowia lipolytica* fermentacijom na uljanoj pogači; 6) Proizvodnja lipaza i proteaza pomoću *Yarrowia lipolytica* iz otpadne vode submerznim postupkom; 7) Proizvodnja lipaza i proteaza pomoću *Candida rugosa* fermentacijom na čvrstoj podlozi; 8) Proizvodnja lipaza i proteaza iz *Candida rugosa* fermentacijom u otpadnoj vodi iz mlina primenom submerzne tehnike gajenja i 9) Poređenje različitih bioprocasa za proizvodnju lipaza i proteaza na otpadnim tokovima iz uljne industrije. U prvom i drugom potpoglavlju prikazane su vrednosti koje se odnose na hemijski sastav i osnovna svojstva uljane pogače i otpadne vode, odnosno dati su sadržaj vlage

supstrata, sadržaj redukujućih i ukupnih ugljenih hidrata, sadržaj proteina, sadržaj lipida, sadržaji pepela, kao i hemijska i biološka potrošnja kiseonika otpadne vode (HPK i BPK). Dobijeni rezultati su diskutovani sa aspekta dalje primene uljane pogače i otpadne vode kao supstrata za fermentaciju i proizvodnju enzima.

U trećem potpoglavlju Rezultata i diskusije prikazani su rezultati koji se odnose na optimizaciju procesa fermentacije uljane pogače pomoću kvasca *C. utilis* pri čemu su korišćena dva eksperimentalna pristupa: klasičan način kada se ispituje uticaj jednog procesnog parametra, dok su ostale vrednosti parametara konstantne, i statistički pristup planiranih eksperimenata, kada se istovremeno ispituje uticaj većeg broja procesnih parametara po utvrđenom eksperimentalnom planu. U početnim ispitivanjima ispitana je kinetika mikrobnog rasta i kinetika biosinteze proteaza i lipaza prilikom fermentacije neobogaćene uljane pogače i utvrđeno je da je rast biomase praćen biosintezom lipaze pri čemu se dotiže njihov maksimum posle četiri dana fermentacije, dok je maksimalni prinos proteaza postignut posle pet dana. Pokazano je da se može postići relativno dobar prinos lipolitičke i proteolitičke aktivnosti od 14,3 IU/g i 58,0 IU/g čvrstog supstrata redom čak i korišćenjem neobogaćene pogače kao supstrata. U trećem potpoglavlju su zatim prikazani rezultati vezani za ispitivanje uticaja obogaćivanja pogače različitim prostim i složenim ugljenim hidratima, uljima, masnim kiselinama i organskim i neorganskim izvorima azota, pri čemu je pokazano da je biosinteza proteaza podložna snažnoj kataboličkoj represiji glukozom, skrobom, laktozom i ostalim šećerima, dok je biosinteza lipaze manje podložna. Interesantno da proizvodnja lipaze iz *C. utilis* pod datim uslovima nije indukovana oleinskom kiselinom niti drugim masnim kiselinama i uljima, dok je dodatak maltoze doprineo statistički značajnom povećanju prinosa oba enzima. Dodatna optimizacija sastava i veličine čestica fermentacione podloge kao i parametara procesa pokazala je da su vreme fermentacije, sadržaj vlage i veličina inokuluma jedni od najvažnijih parametara koji utiču na proizvodnju oba enzima. Kvantitativno je razmatren uticaj procesnih parametara na količinu proizvedenih enzima i njihove međusobne interakcije. Pokazano je da se maksimalni prinosi proteaza i lipaza dobijaju pri nekom optimalnom sadržaju vlage od oko 55-60%, dok manje količine inokuluma pogoduju biosintezi lipaze. Uticaj veličine inokuluma na proizvodnju proteaza je nešto složeniji jer je u interakciji sa ostalim procesnim parametrima.

U trećem poglavlju prikazani su i rezultati uticaja alkalnog pretretmana supstrata na rast biomase i proizvodnju enzima, kao i rezultati dobijeni prilikom izvođenja fermentacije na mešovitoj hranljivoj podlozi sastavljenoj od uljane pogače i mekinja ječma pri različitim odnosima. Posebno je diskutovana mogućnost povećanja dodatne vrednosti uljane pogače fermentacijom sa aspekta primene u ishrani stoke, odnosno određen je hemijski sastav pogače nakon fermentacije pri čemu je potvrđeno da dolazi do povećanja sadržaja proteina i smanjenja sadržaja vlakana. Dakle, primena *C. utilis* kao stočnog kvasca za fermentaciju uljane pogače otvara mogućnost razvoja integrisanog procesa u kojem će se dobiti visoka vrednost produkovanih lipaza i proteaza uz dobijanje nutritivno vredne biomase.

U četvrtom potpoglavlju Rezultata i diskusije prikazani su rezultati koji se odnose na optimizaciju proizvodnje lipaza i proteaza fermentacijom otpadne vode iz industrije ulja definisanog sastava pomoću istog kvasca. Prikazani su rezultati ispitivanja uticaja dodatka različitih izvora azota i ugljenika u hranljivu podlogu na kinetiku rasta *C. utilis* i proizvodnju proteaza i lipaza. Iako je kvasac pokazao dobar rast i sposobnost biosinteze oba enzima na otpadnoj vodi iz mlina, dodatak površinski aktivnih materija (Tween 80) kao i maltoze, amonijum-sulfata i kvašćevog ekstrakta je doprino značajnom povećanju proizvodnje oba enzima.

U petom i šestom potpoglavlju Rezultata i diskusije prikazani su rezultati uticaja različitih procesnih parametara na proizvodnju lipaza i proteaza fermentacijom uljane pogače i otpadne vode iz mlina pomoću kvasca *Yarrowia lipolytica*. Optimizacija sastava hranljive podloge i procesnih parametara je izvršena na isti način kao i u slučaju korišćenja *C. utilis*. Ispitani su uticaji različitih parametara, koji pokazuju pozitivne efekte na regulacijske mehanizme biosinteze enzima, kako bi se odredili optimalni parametri produkcije enzima. Pokazano je da je proizvodnja lipaze i proteaze i u ovom slučaju indukovana dodatkom određenih supstanci, kao što su maltoza i kvašćev ekstrakt, u hranljivu podlogu. Dodatna optimizacija procesnih parametara i načina izvođenja procesa pokazala

je da su, pored sastava hranljive podloge, veličina inokuluma i sadržaj vlage veoma važni faktori proizvodnje enzima, dok se značajno veći prinosi oba enzima mogu postići primenom supstrata koji je prethodno tretiran alkalijama ili ultrazvukom visokog intenziteta pod određenim uslovima. Nakon pretretmana dolazi do promene kinetike mikrobnog rasta i biosinteze enzima zbog promene hemijskog sastava supstrata i povećanja ukupnog sadržaja lako iskoristivih ugljenih hidrata.

U sedmom potpoglavlju ispitana je mogućnost rasta kvasca *Candida rugosa* i biosinteze enzima na uljanoj pogači koja se dobija nakon ekstrakcije maslinovog ulja. Rezultati su pokazali da i u ovom slučaju alkalni pretretman uljane pogače doprinosi povećanju proizvodnje lipaza za 103% i proteaza 33% u odnosu na proizvodnju sa netretiranim supstratom. U osmom potpoglavlju dat je prikaz rezultata vezanih za optimizaciju proizvodnje lipaza i proteaza pomoću *C. rugosa* pri submerznom gajenju na otpadnoj vodi iz mlina. Iako je kvasac iz *C. rugosa* pokazao dobar rast i sposobnost biosinteze lipaza i proteaza u toku submerzne fermentacije, obogaćivanje hranljive podloge sa kvašćevim ekstraktom, maltozom, amonijum-sulfatom, maslinovim uljem i peptonom je dovelo do povećanja proizvodnje lipaza i do sedam puta u odnosu na neobogaćenu hranljivu podlogu.

U devetom potpoglavlju napravljeno je poređenje svih ispitanih bioprocasa za proizvodnju lipaza i proteaza sa aspekta prinosa enzima pod optimalnim uslovima. Diskutovani su regulatorni mehanizmi biosinteze enzima u slučaju korišćenja različitih tehnika kultivacije i kvasaca. Na osnovu dobijenih rezultata o uticajima dodatka određenih supstanci u hranljivu podlogu na količinu proizvedenog enzima, utvrđeno je da mogu da se razlikuju regulatorni mehanizmi biosinteze lipaza u slučaju istog proizvodnog mikroorganizma kada se primenjuju različite tehnike gajenja, kao i kod različitih mikroorganizama u slučaju istih tehnika fermentacije. Tako, utvrđeno je da dodatak maltoze ima pozitivan uticaj na biosintezu lipaze i proteaze u slučaju fermentacije *C. utilis* na uljanoj pogači, dok je biosinteza lipaze u slučaju iste tehnike gajenja za *Y. lipolytica* podložna kataboličkoj represiji maltozom.

3. OCENA DISERTACIJE

3.1. Savremenost i originalnost

Nedostatak sirovina i sve veća svest o zaštiti životne sredine stavila je u prvi plan potrebu racionalnog korišćenja obnovljivih sirovina i iskorišćenja nusproizvoda ili otpada prehrambene industrije i poljoprivrede. Poljoprivredni i industrijski otpad je veliki zagađivač životne sredine. Poznato je da je industrija maslina i maslinovog ulja od velikog značaja za mediteranske zemlje. U toku proizvodnje ulja generišu se velike količine tečnog i čvrstog otpada. Po nekim podacima, preradom 1 tone svežih maslina dobija se 210-215 kg maslinovog ulja, 490-550 kg uljane pogače (čvrsti otpad) i 1-1,65 m³ otpadne vode iz mlina (tečni otpad), dok se od jedne tone uljane repice dobija 350 kg ulja i 650 kg uljane pogače (zbog poređenja). Uljana pogača koja se dobija nakon ekstrakcije ulja ima još uvek visok sadržaj nutritivno vrednih supstanci uključujući lipide, ugljene hidrate i proteine, kao i značajnu količinu drugih vrednih supstanci (polifenola, nezasićenih masnih kiselina), što je čini odličnim potencijalnim supstratom za fermentacione procese. Međutim, veoma male količine ovog važnog industrijskog sporednog proizvoda se valorizuju.

Brzi razvoj biotehnologije predstavlja mogućnost za efikasnu eksploataciju ovih nusproizvoda ili otpada tako što se biotehnološki konvertuju u niz korisnih proizvoda uključujući, između ostalih, i industrijske enzime. Posebna pažnja u savremenim istraživanjima je usmerena na razvoj efikasnih fermentacionih procesa na čvrstim podlogama kao što je uljana pogača. Ovakav vid procesa je jednostavan u pogledu procesne opreme kao i kontrole parametara, ekonomičan je i potencijalno se mogu ostvariti veći prinosi enzima u poređenju sa submerznim procesima ukoliko se izvrši pravilan odabir proizvodnog soja i optimizuju parametri procesa. Upravo je to bio predmet rada ove doktorske disertacije, odnosno u radu su ispitane mogućnosti dobijanja industrijskih enzima (lipaza i proteaza) fermentacijom uljane pogače i otpadne vode iz mlina, koji nastaju u toku proizvodnje maslinovog ulja, pomoću različitih mikroorganizama i tehnika gajenja.

Proizvodnja lipaza i proteaza pomoću različitih komercijalnih sojeva fermentacijom na čvrstim i tečnom otpadu svakako nije novi problem i u literaturi postoji veliki broj radova u kojima su korišćeni različiti otpadni materijali i proizvodni mikroorganizmi, uglavnom plesni (*Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.). Međutim, iako je utvrđeno da se i kvasci mogu uspešno gajiti na čvrstim supstratima u uslovima bez slobodne vode, veoma mali broj istraživanja se bavi proizvodnjom ekstracelularnih enzima u ovim uslovima. Originalnost ideje koja je realizovana u okviru istraživanja u toku izrade ove doktorske disertacije je primena različitih kvasaca (*C. utilis*, *C. rugosa* i *Y. lipolytica*), od kojih je jedan izolovan iz prirodnog staništa, za proizvodnju ekstracelularnih lipaza i proteaza fermentacijom na uljanoj pogači kao čvrstom supstratu. Pažljivom optimizacijom sastava hranljive podloge i procesnih parametara pokazano je da je moguće postići prinose enzima koji su uporedivi sa prinosima postignutim sa komercijalnim sojevima i značajno skupljim supstratima. Isto tako, veoma malo radova u naučnoj literaturi se bavi problemom valorizacije otpadne vode iz industrije ulja.

3.2. Osvrt na referentnu i korišćenu literaturu

U okviru Disertacije rezultati postignuti od strane drugih autora citirani su sa 411 literaturnih navoda koji su omogućili da se prikaže stanje u datoj oblasti. Vidi se da se radi o izuzetno aktuelnoj problematici jer su lipaze i proteaze industrijski važni enzimi, a njihova proizvodnja pomoću alternativnih sojeva i sirovina je naročito značajan predmet savremenih istraživanja. Poslednjih decenija vršena su intenzivna ispitivanja koja su imala za cilj valorizaciju različitih sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije ulja i drugog poljoprivrednog materijala biotehnoškom konverzijom u industrijski važne proizvode, kao što su enzimi. Pri tome su korišćeni različiti prirodni i rekombinantni mikroorganizmi, uglavnom plesni. Međutim, kvasci i bakterije se sve više kultiviraju na čvrstim hranljivim podlogama, pa je došlo do značajnog napretka i u toj oblasti. Pronalaženje novih prirodnih sojeva koji produkuju lipaze i proteaze poboljšanih svojstava pogodnih za različite komercijalne primene, kao na primer, u detergentima, ili kao biokatalizatore za različite biokatalitičke procese u nevedenim sistemima je takođe sve više predmet aktuelnih istraživanja. Za većinu komercijalnih lipaza su literaturno poznati uslovi proizvodnje, dok je mali broj radova posvećen dobijanju lipaze pomoću kvasaca *C. utilis* ili *Y. lipolytica*.

Iz popisa literature koja je data u ovoj doktorskoj disertaciji uočava se adekvatno poznavanje aktuelnog stanja istraživanja u ovoj oblasti u svetu, kao i poznavanja osnovnih problema i spornih pitanja. Ovakav literaturni pregled je pružio odličnu bazu za kritičku analizu rezultata postignutih u Disertaciji. Veliki značaj Disertacije ogleda se u činjenici da se korišćenjem sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije ulja i odabranih sojeva mikroorganizama u optimizovanom tehnološkom procesu može značajno smanjiti cena koštanja enzima što čini enzimске procese konkurentne sa hemijskim.

3.3. Opis i adekvatnost primenjenih naučnih metoda

Hemijski sastav sirove i fermentisane uljane pogače kao i otpadne vode iz mlina određen je primenom standardnih metoda (AOAC). Sadržaj ukupnih masti u uljanoj pogači određen je metodom po Soksletu (Soxhlet) nakon ekstrakcije uzorka sa *n*-heksanom na 60 °C u toku 20 h, sadržaj vlage Karl-Fišerovom metodom, sadržaj ukupnih polifenola metodom po Folin-Ciocalteu, određivanje sirovih belančevina po Kjeldalu (Kjeldahl), određivanje redukujućih šećera DNS (dinitrosalicilnom) metodom i/ili po Bertrand-u, određivanje sadržaja vlakana i celuloze u skladu sa metodom Kurschner-Scharrer-a. Standardna aktivnost lipaza je određivana spektrofotometrijskom metodom pri čemu se koristio *p*-nitrofenil-palmitat kao supstrat. Aktivnost proteolitičkih enzima je takođe određivana spektrofotometrijskom metodom kojom je praćen tok hidrolize azokazeina, tj. kazeina hemijski modifikovanog sulfanilnom bojom.

U radu je ispitano veliki broj mikroorganizama sa aspekta proizvodnje lipaza i proteaza, pre svega iz kolekcije kultura Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao i komercijalnih lipolitičkih sojeva iz ARS (NRRL) kolekcije kultura (SAD). Primarna selekcija je

izvršena na osnovu pokazanih aktivnosti na tributirin agru kao selektivnom medijumu i kao dobri producenti lipaza izdvojili su se sledeći mikroorganizmi: *Pseudomonas aeruginosa* san-ai, *Pseudomonas putida* NRRL B-21, *Candida utilis* TMF, *Candida rugosa* NRRL Y-95, *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 i drugi. Među ispitivanim sojevima je i *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 za koju je utvrđeno da sintetiše lipazu u velikom prinosu kada raste na drugim otpadnim poljoprivrednim materijalima. Nakon primarne selekcije soja producenta, izabrani sojevi su potom uzgajani na uljanoj pogači pri čemu je praćena kinetika rasta i prinos lipolitičke aktivnosti. Izabrani mikroorganizmi su zatim ispitani i sa aspekta proizvodnje ekstracelularnih proteaza, uzgajanjem sojeva na mlečnom kazein agru. Mikroorganizmi koji su pokazali dobar rast na uljanoj pogači i koji su ocenjeni kao potencijalni dobri producenti lipaza i proteaza izabrani su kao proizvodni mikroorganizmi u daljim ispitivanjima (*C. utilis*, *Y. lipolytica* i *C. rugosa*). Kinetika biosinteze enzima u toku submerzne fermentacije praćena je preko ukupne lipolitičke i proteolitičke aktivnosti, sadržaja proteina (određena metodom po Loriju (Lowry)) i praćena je kinetika rasta mikroorganizma klasičnim mikrobiološkim metodama.

Proizvodnja lipaza i/ili proteaza pomoću odabranih mikroorganizama vršena je tehnikom gajenja na čvrstim podlogama, odnosno bez prisustva slobodne vode, i submerznom fermentacijom. U preliminarnim ispitivanjima određeni su parametri koji imaju značajan uticaj na proizvodnju lipaza i proteaza u slučaju primene oba procesa, kao i intervali tih uticaja, a zatim su njihove vrednosti optimizovati metodom planiranih eksperimenata u konkretnom procesu sa odabranim mikroorganizmom i tehnikom gajenja. Stoga, nakon preliminarnih kvalitativnih odabira efikasnih induktora i stimulatora proizvodnje lipaza i proteaza, izvršena je optimizacija procesnih parametara primenom metoda planiranih eksperimenata. Višeparameterska analiza dobijenih rezultata izvršena je korišćenjem statističkog i matematičkog programskog paketa MATLAB. Statističkom obradom dobijenih eksperimentalnih podataka procenjeni su uticaji pojedinačnih faktora, kao i njihovi međusobni efekti na biosintezu lipaza i proteaza. Pored toga, statistički metod omogućio je dobijanje odgovarajućih matematičkih modela na osnovu kojih može da se predvidi ponašanje sistema u zavisnosti od procesnih parametara i omogućiti pouzdana kontrola i regulacija procesa.

Separacija proizvedenih ekstracelularnih enzima fermentisane pogače vršena je ekstrakcijom. Prilikom submerzne fermentacije, ekstracelularni enzimi su odvajani centrifugovanjem. Dobijeni enzimi su se dalje u odbranim slučajevima prečišćavali frakcionim taloženjem amonijum-sulfatom, organskim rastvaračima, kao i metodama jonoizmenjivačke i gel-filtracione hromatografije. Čistoća i molekulska masa proizvedenih lipaza/proteaza određena je metodom nativne i SDS-PAGE elektroforeze

3.4. Primenljivost ostvarenih rezultata

Na osnovu pregleda rezultata prikazanih u okviru ove Disertacije uočava se da je ostvaren značajan doprinos u razvoju novih biotehnoških procesa za proizvodnju lipaza i proteaza korišćenjem otpadnih tokova iz industrije ulja. Koristeći ovakve podloge za gajenje odabranih sojeva mikroorganizama, producenata enzima, moguće je da se smanji cena koštanja enzima što potencijalno čini industrijske enzimske procese konkurentne sa hemijskim. Pored toga, ovim se potencijalno rešavaju problemi zagađivanja životne sredine jer direktno odlaganje poljoprivrednih nusproizvoda kao i otpada u životnu sredinu doprinosi njenom velikom zagađenju.

Poslednjih decenija vršena su intenzivna ispitivanja koja su imala za cilj valorizaciju različitih sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije ulja i drugog poljoprivrednog materijala biotehnoškom konverzijom u industrijski važne proizvode, kao što su enzimi. Pri tome su korišćeni različiti prirodni i rekombinantni mikroorganizmi, uglavnom kvasci i plesni. Međutim, i bakterije se sve više kultivisu na čvrstim hranljivim podlogama, pa je došlo do značajnog napretka u toj oblasti. Pronalaženje novih prirodnih sojeva koji produkuju lipaze i proteaze poboljšanih svojstava pogodnih za različite komercijalne primene, kao na primer, u detergentima, ili kao biokatalizatore za različite biokatalitičke procese u nevedenim sistemima je takođe sve više predmet aktuelnih istraživanja. Za većinu komercijalnih lipaza su literaturno poznati uslovi proizvodnje, dok

je mali broj radova posvećen dobijanju i karakterizaciji lipaze pomoću kvasaca *C. utilis* ili *Y. lipolytica*. Sa druge strane, dobro je poznata nutritivna vrednost ovih mikroorganizma, pa je pokazano da se nakon fermentacije uljane pogače, pored proizvodnje enzima, povećala i dodatna vrednost tog nusproizvoda kao stočne hrane. U Srbiji nema podataka o proizvodnji enzima na bilo kakvom poljoprivrednom otpadu ni na nivou pilot postrojenja. Stoga je ispitivanje novih biotehnoloških procesa i pravaca za sintezu enzima na poljoprivrednom otpadu ekonomski veoma opravdano.

3.5. Ocena dostignutih sposobnosti kandidata za samostalni naučni rad

Kandidat Mr. Omar Ali Saied Moftah je tokom izrade doktorske disertacije ispoljio zaista izuzetnu stručnost u realizaciji eksperimenata i korišćenju različitih tehnika i metoda, a pri analizi rezultata je pokazao samostalnost, sistematičnost i kreativnost. Kandidat ima izuzetnu sklonost ka eksperimentalnom radu i racionalni pristup u razvoju i realizaciji eksperimenatalnih tehnika. Na osnovu dosadašnjeg zalaganja i postignutih rezultata Komisija je mišljenja da kandidat poseduje sve kvalitete neophodne za samostalni naučno-istraživački rad.

4. OSTVARENI NAUČNI DOPRINOS

4.1. Prikaz ostvarenih naučnih doprinosa

Naučni doprinos ove teze može se posmatrati sa sledećih stanovišta:

- U okviru teze izabrani su novi mikroorganizmi koji proizvode lipaze i proteaze iz kolekcija kultura Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, među kojima se nalaze prirodni izolati, i koji pokazuju veliki potencijal za komercijalnu primenu u ovoj oblasti.
- Utvrđena je kinetika rasta i kinetika biosinteze ekstracelularnih lipaza i proteaza pri fermentaciji uljane pogače i otpadne vode iz industrije ulja pomoću tri odbrana kvasca i to *C. utilis*, *C. rugosa*, *Y. lipolytica*.
- Definisani su optimalni procesni parametri i sastavi hranljive podloge kojima se modifikuju regulatorni putevi biosinteze enzima sa ciljem povećanja prinosa lipaza i proteaza pri korišćenju tri odabrana proizvodna mikroorganizma (*C. utilis*, *C. rugosa*, *Y. lipolytica*). Modifikacija regulatornih puteva biosinteze enzima omogućila je dobijanje enzimskih preparata zadovoljavajućih prinosa i sastava.
- Utvrđeni su uticaji tehnike gajenja na kinetiku ćelijskog rasta i regulatorne mehanizme biosinteze lipaza i proteaza pri korišćenju odabranih proizvodnih sojeva kvasaca.
- Izvršena je valorizacija pogača koje zaostaju nakon ekstrakcije maslinovog ulja kao supstrata za kultivaciju odabranih sojeva kvasaca u cilju proizvodnje industrijski važnih enzima.
- Izvršena je valorizacija otpadne vode iz mlina nakon prerade maslina kao supstrata za kultivaciju odabranih sojeva kvasaca submernim postupkom u cilju proizvodnje industrijski važnih enzima.

4.2. Kritička analiza rezultata istraživanja

Pregledom dostupne literature koja razmatra efikasnost i ekonomičnost proizvodnje lipaza i proteaza pomoću različitih fermentacionih procesa na različitim poljoprivrednim otpadima kao što su ostaci šećerne trske, pšenična sačma, sojina sačma, kukuruzni klipovi, voćne kaše i otpad iz prerade i proizvodnje ulja, kao i razmatranjem rezultata istraživanja dobijenih primenom odabrane metodologije u ovoj doktorskoj disertaciji, može se uočiti da nekoliko optimizovanih procesa u potpunosti zadovoljavaju neophodne uslove za aplikaciju u ovoj oblasti. Imajući u vidu

produktivnost procesa, postignute prinose lipaza i proteaza, činjenicu da se u Srbiji generišu velike količine otpada iz uljne industrije, od kojih su samo male količine iskorišćene, netoksičnost i nutritivnu vrednost kvasaca koji su korišćeni kao proizvodni mikroorganizmi, kao i svojstva proizvedenih enzima, rezultati ove doktorske disertacije daju nesumnjivi naučni i aplikativni značaj i predstavljaju značajan korak ka valorizaciji otpadnih tokova iz industrije ulja. Naročito je postignuta velika produktivnost lipaza i proteaza pri fermentaciji prethodno pretretirane uljane pogače kvascima *C. utilis* i *Y. lipolytica*, kada se postižu prinosi lipaze od 33,3-40 IU g⁻¹ čvrstog supstrata i proteaze od 110 IU/g što je uporedivo sa prinosima postignutim sa komercijalnim sojevima na dosta složenijim i skupljim hranljivim podlogama. Sa druge strane, dobro je poznata nutritivna vrednost ovih mikroorganizama, pa bi se nakon fermentacije uljane pogače, pored proizvodnje enzima, povećala i dodana vrednost tog nusproizvoda kao stočne hrane.

4.3. Verifikacija naučnih doprinosa

Iz Disertacije su do sada objavljena dva rada: jedan u istaknutom međunarodnom časopisu M22 i dva rada u međunarodnom časopisu M23. Pored toga, kandidat Omar Ali Saied Moftah je rezultate svog istraživanja tokom izrade ove disertacije potvrdio saopštavanjem 4 rada na međunarodnim i nacionalnim skupovima, koji su štampani u celini.

Kategorija M22 Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. **O. A. S. Moftah**, S. Grbavčić, M. Žuža, N. Luković, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation“, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166(2)** (2012) 348-364. (ISSN: 0273-2289; IF(2010) 1,879; 79/160 Biotechnology & Applied Microbiology).

Kategorija M23 Rad u međunarodnom časopisu

1. **O. A. S. Moftah**, S.Ž. Grbavčić, W.A.S. Moftah, N.D. Luković, O.L. Prodanović, S.M. Jakovetić, Z.D. Knežević-Jugović, Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates, *Journal of Serbian Chemical Society*, **78(6)** (2013) 781-794. (ISSN: 0352-5139; IF(2012) 0,912; 100/152 Chemistry, Multidisciplinary).

2. S. Šaponjić, Z.D. Knežević-Jugović, D.I. Bezbradica, M.G. Žuža, **O. A. Saied Moftah**, N. Bosković-Vragolović, D.Ž. Mijin, Use of *Candida rugosa* lipase immobilized on sephabeads for the amyl caprylate synthesis: Batch and fluidized bed reactor study, *Electronic Journal of Biotechnology*, **13(6)** (2010) (ISSN: 0717-3458; IF(2011) 0,968; 125/158 Biotechnology & Applied Microbiology).

Kategorija M33 Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u celosti

1. **O. A. S. Moftah**, S. Ž. Grbavčić, W.A.S. Moftah, Z.D. Knežević-Jugović, Lipase production by yeasts using olive mill wastewater, *Proceedings of 40th International Conference of SSCHE*, J. Markoš, ed., May 27-31, 2013, Slovakia, pp. 1372-1378, ISBN 978-80-89475-09-4.

2. S. Grbavčić, N. Ognjanović, M. Žuža, **O. Ali Saied Moftah**, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, *Pseudomonas putida* lipase: production, properties and applicability as detergent additive, *Proceedings of the 39th International Conference of SSCHE*, J. Markoš, ed., Tatranské Matliare, Slovakia, May 21-25, 2012, pp. 1433-1438, ISBN 978-80-89475-04-9.

Kategorija M 63 Radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u celosti

1. Sanja Grbavčić, **Omar Ali Saied**, Jelena Jovanović, Nevena Luković, Milena Žuža, Dejan Bezbradica, Zorica Knežević-Jugović, “Proizvodnja lipaza i proteaza iz *Candida utilis* tehnikom

gajenja na čvrstoj podlozi”, Biotehnologija za održivi razvoj, Tehnološko-metalurški fakultet, 24-26. Novembar 2010., Beograd, CD radova u celosti, ISBN: 978-86-7401-269-7, str. 49-52.

2. **O. A. S. Moftah**, S. Grbavčić, N. Luković, M. Žuža, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, "Karakterizacija lipaze iz *Candida utilis* dobijene tehnikom gajenja na čvrstoj podlozi korišćenjem uljane pogače maslina kao supstrata", 49. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Tehnološki fakultet, Kragujevac, 2011, knjiga radova, str. 151-155.

5. ZAKLJUČAK I PREDLOG

Rezultati istraživanja u okviru doktorske disertacije kandidata Mr. Omara Ali Saied Moftah predstavljaju naučni doprinos o razumevanju uticaja različitih procesnih parametara, tehnika gajenja i vrste proizvodnog mikroorganizma na proizvodnju lipaza i proteaza fermentacijom sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije maslinovog ulja. Optimizacija procesnih parametara je omogućila sagledavanje zakonitosti koje imaju krucijalne efekte na regulatorne mehanizme biosinteze enzima. Pored toga, rezultati imaju i praktični doprinos u rešavanju problema zagađivanja životne sredine preradom otpadnih tokova industrije maslinovog ulja u komercijalno važne proizvode.

Komisija je konstatovala da podneta doktorska disertacija ima sve neophodne sadržaje i da je napisana u skladu sa uobičajenim standardima. Na osnovu svega smaramo da su ispunjeni svi ciljevi i zadaci rada na ovoj tezi i da ona svojim sadržajem i kvalitetom značajno doprinosi oblasti Tehnološko inženjerstvo, što je potvrđeno objavljivanjem radova u međunarodnim časopisima kao i saopštavanjem radova na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Takođe, Komisija je mišljenja da je kandidat ispoljio naučno-istraživačku sposobnost u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološkog-metalurškog fakulteta da se doktorska teza pod nazivom „**Proizvodnja proteaza i lipaza fermentacijom sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije maslinovog ulja**” kandidata Omar Ali Saied Moftah prihvati, izloži na uvid javnosti i uputi na konačno usvajanje Veću naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu. Takođe, da se nakon završetka ove procedure, kandidat pozove na usmenu odbranu doktorske disertacije pred Komisijom u istom sastavu.

ČLANOVI KOMISIJE

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

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

.....
Prof. dr Maja Vukašinović Sekulić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Prof. dr Mirjana Antov, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet