

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/494
(Број захтева)

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ТЕХНИЧКИХ НАУКА
(Назив већа научне области и коме се захтев упућује)

23.10.2015.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Пољопривредни и индустријски отпад као супстрат за производњу целулаза и амилаза помоћу новог бактеријског соја *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ХЕМИЈА И ХЕМИЈСКА ТЕХНОЛОГИЈА

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

Мр КАТАРИНА (Радослав) МИХАЈЛОВСКИ, дипл. инж.

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао високо образовање: Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

3. Година дипломирања: 2003.

4. Назив магистарске тезе кандидата: **Проучавање и избор природних једињења за производњу текстилних материјала са антимикробним својствима**

5. Назив факултета на коме је магистарска теза одбрањена Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

6. Година одбране магистарске тезе: 2007.

Обавештавамо Вас да је Наставно-научно веће,
(назив надлежног тела Факултета)

на седници одржаној 22.010.2015. године размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

ДП

На основу чл. 128. Закона о високом образовању и чл. 129. Статута ТМФ-а, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 22.10.2015. године, донета је

О Д Л У К А
о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **мр КАТАРИНЕ МИХАЈЛОВСКИ**, дипл. инж., под називом: **„Пољопривредни и индустријски отпад као супстрат за производњу целулаза и амилаза помоћу новог бактеријског соја *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1“**

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За ментора се одређује **др Сузана Димитријевић-Бранковић**, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Одлуку доставити: Универзитету у Београду на сагласност, кандидату, менторима, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

Додатак уз образас 1.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата Катарину Михајловски, дипл. инж. тех.

Име и презиме ментора: Сузана Димитријевић-Бранковић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Pavlović M., Buntić A., Mihajlovski K., Šiler-Marinković S., Antonović D., Radovanović Ž., **Dimitrijević-Branković S.**: Rapid Cationic Dye Adsorption On Polyphenol-Extracted Coffee Grounds—A Response Surface Methodology Approach. *Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers*, Vol 45, No 4, **2014**, pp. 1691-1699. (ISSN 1876-1070, IF 3.000).
2. Marija Ranic, Marina Nikolic, Marija Pavlovic, AnetaBuntic, Slavica Siler-Marinkovic and **Suzana Dimitrijevic-Brankovic**, Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology, *Journal of Cleaner Production*, Volume 80, **2014**, Pp 69-79 (ISSN 0959-6526, IF 3.398)
3. Milica Milutinović, Neda Radovanović, Marija Ćorović, Slavica Šiler-Marinković, Mirjana Rajilić-Stojanović, **Suzana Dimitrijević-Branković**, Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust, *Industrial Crops and Products*, Vol 77, **2015**, Pp 333–341 (ISSN 0926-6690, IF 2.837)
4. Lazić, Va, Radoičić, M., Šaponjić, Z., Radetić, T., Vodnik, V., Nikolić, S., **Dimitrijević, S.**, Radetić, M., Negative influence of Ag and TiO₂ nanoparticles on biodegradation of cotton fabrics, *Cellulose*, Volume 22, No 2, **2015**, Pages 1365-1378 (ISSN 0969-0239, IF 3.573)
5. Mihajlovski K., Radovanović N., Miljković M., Šiler-Marinković S., Rajilić-Stojanović M., **Dimitrijević-Branković S.**: β -amylase production using packaging-industry wastewater by a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS 1, *RSC Adv.*, **2015**, Accepted Manuscript DOI: 10.1039/C5RA11964B (ISSN 2046-2069, IF 3.840)

Заокружити одговарајућу опцију (А, Б, В или Г):

А) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техникотехнолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има најмање три рада са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

Б) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има најмање три рада са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

В) У случају израде докторске дисертације према ранијим прописима за кандидате који су стекли академски назив магистра наука ментор треба да има пет радова (референци) које га, по оцени Већа научних области, квалификују за ментора односне дисертације.

Г) У случају да у ужој научној области нема квалификованих наставника, приложити одлуку Већа докторских студија о именовању редовног професора за ментора.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Датум: 14.10.2015

М.П.

Проф. др Ђорђе Јанаћковић

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

Predmet: Podobnost teme i kandidata **mr Katarine Mihajlovski, dipl. inž.** za izradu doktorske disertacije

Odlukom br. 35/375 od 23.09.2015. godine, imenovani smo za članove komisije za ocenu podobnosti teme kandidata **mr Katarine Mihajlovski, dipl. inž.** za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme **Poljoprivredni i industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju celulaza i amilaza pomoću novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1.** Na osnovu materijala priloženog uz Zahtev kandidata, Komisija podnosi sledeći

REFERAT

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografski podaci

Kandidat **mr Katarina R. Mihajlovski**, dipl. inž. tehnologije, rođena je 1978. godine u Beogradu. Osnovnu školu i XI beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Godine 1997. upisala je studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu. Diplomirala je 17.02.2003. godine na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologije sa prosečnom ocenom 8,97, odbranivši diplomski rad na temu „Ispitivanje uticaja ekstrakta omana (*Inula Helenium*) na rast izolata *Bifidobacterium* sp.“ sa ocenom 10. Po završetku redovnih studija, upisala je magistarske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologije. Bila je stipendista Ministarstva nauke u periodu od 01.04.2003.-31.12.2006, a nakon toga zasniva radni odnos na TMF-u na Katedri biohemijsko inženjerstvo i biotehnologije i stiče zvanje istraživač pripravnik, februara 2007. god. Pohađala je i stekla diplomu kursa: International Summer School and Training Course on „Cell and Tissue Engineering“, TMF, Beograd, 1-8 jul 2006. Magistarsku tezu na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu pod nazivom „Proučavanje i izbor prirodnih jedinjenja za proizvodnju tekstilnih materijala sa antimikrobnim svojstvima“ odbranila je 14. februara 2007. godine.

Kao stipendista Ministarstva nauke bila je angažovana na dva naučno-istraživačka projekta, i to: "Biofermentisani sokovi na bazi biljnih sirovina" (BTH.7.1.4.0721.B, Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, 2003-2005) i "Razvoj biomedicinskih tekstilnih materijala i proizvoda programiranih svojstava" (Tehnološki razvoj, TR6713, Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, 2006-2007). Kao istraživač-pripravnik bila je angažovana na naučno-istraživačkom projektu: "Razvoj biomedicinskih tekstilnih materijala i proizvoda programiranih svojstava" (Tehnološki razvoj, TR6713, Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, 2007-2008). Zvanje istraživač-saradnik stiče 26.02.2008. godine. Kao istraživač-saradnik bila je angažovana na projektu "Razvoj novih prehrambenih i dijetetskih proizvoda sa medicinskim gljivama i lekovitim biljem" (Tehnološki razvoj, TR20049, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, 2008-2010). Trenutno učestvuje u istraživanjima u okviru projekta "Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije" (Tehnološki

razvoj, TR 31035, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije) i "Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji" (III 41030).

Od školske 2004/2005. godine, učestvuje u izvođenju vežbi iz sledećih predmeta: "Ekološka mikrobiologija" (zimski semestar školske 2004/2005, 2005/2006, 2006/2007, 2007/2008 i 2008/2009), "Tehnologija mikrobnih metabolita" (letnji i zimski semestar 2004/2005 i 2008/2009) na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologije.

1.2. Stečeno naučno-istraživačko iskustvo

Magistarski rad: Proučavanja i izbor prirodnih jedinjenja za proizvodnju tekstilnih materijala sa antimikrobnim svojstvima

Oblast istraživanja: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologije

Mentor: Dr. Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor

Datum odbrane: 14.02.2007. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Objavljeni naučni radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (**M21**):

1. Dimitrijević S., **Mihajlovski K.**, Antonović D., Milanović-Stevanović M., Mijin D.: *A Study of the Synergistic Antilisterial Effects of a Sub-lethal Dose of Lactic Acid and Essential Oils from Thymus vulgaris L., Rosmarinus officinalis L. and Origanum vulgare L.* Food Chemistry Vol 104, No 2, **2007**, pp.774–782, (ISSN 0308- 8146, IF 3.052).

2. Janjić S., Kostić M., Vučinić V., Dimitrijević S., **Popović K.**, Ristić M., Škundrić P.: *Biologically active fibers based on chitosan-coated lyocel fibers*, Carbohydrate Polymers, Vol 78, No 2, **2009**, pp. 240-246, (ISSN 0144-8617, IF 3.167).

3. Kramar A., Prysiazhnyi V., Dojčinović B., **Mihajlovski K.**, Obradović B.M., Kuraica M.M., Kostić M.: *Antimicrobial Viscose Fabric Prepared By Treatment In DBD And Subsequent Deposition Of Silver And Copper Ions—Investigation Of Plasma Aging Effect*, Surface and Coatings Technology, Volume 234, **2013**, pp. 92–99, (ISSN 0257-8972, IF 2.199).

4. Pavlović M., Buntić A., **Mihajlovski K.**, Šiler-Marinković S., Antonović D., Radovanović Ž., Dimitrijević-Branković S.: *Rapid Cationic Dye Adsorption On Polyphenol-Extracted Coffee Grounds—A Response Surface Methodology Approach*. Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers, Vol 45, No 4, **2014**, pp. 1691-1699. (ISSN 1876-1070, IF 3.000).

5. **Mihajlovski K.**, Radovanović N., Miljković M., Šiler-Marinković S., Rajilić-Stojanović M., Dimitrijević-Branković S.: *β-amylase production using packaging-industry wastewater by a novel strain Paenibacillus chitinolyticus CKS 1*, RSC Adv., 2015, Accepted Manuscript DOI: 10.1039/C5RA11964B (ISSN 2046-2069, IF 3.840)

Objavljeni naučni radovi uistaknutim međunarodnim časopisima (**M22**):

1. Buntić A., Pavlović M., **Mihajlovski K.**, Randjelović M., Rajić N., Antonović D., Šiler-Marinković S., Dimitrijević-Branković S.: *Removal of a Cationic Dye from Aqueous Solution by Microwave Activated Clinoptilolite—Response Surface Methodology Approach*, Water, Air And Soil Pollution, Vol 225, **2014**, pp. 1816-1828, (ISSN 0049-6979, IF 1.554).

4. Kostić M., Milanović J., Baljak M., **Mihajlovski K.**, Kramar A.: *Preparation And Characterization Of Silver-Loaded Hemp Fibers With Antimicrobial Activity*, *Fibers and Polymers*, Vol 15, No 1, **2014**, pp. 57-64, (ISSN 1229-9197, IF 0.881).

2. **Mihajlovski K.**, Carević M., Dević M., Šiler-Marinković S., Rajilić-Stojanović M., Dimitrijević-Branković S.: *Lignocellulosic Waste Material As Substrate For Avicelase Production By A New Strain Of Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol 104, **2015**, pp. 426-434, (ISSN 0964-8305; IF 2.131)

Objavljeni naučni radovi u međunarodnom časopisu (**M23**) :

1. Rakin M., Mojović Lj., Dimitrijević S., **Mihajlovski K.**, Šiler-Marinković S.: *Investigation of Antimicrobial Activity of Encapsulated Essential Oils*, *Materials Science Forum* Vol 555, **2007**, pp. 429-435, (ISSN 1662-9752, IF 0.399).

2. Milanović J., Mihailović T., **Popović K.**, Kostić M.: *Antimicrobial TEMPO-Oxidized Hemp Fibers With Incorporated Silver Particles*, *Journal of the Serbian Chemical Society*, Vol 77, No 12, **2012**, pp. 1759-1773, (ISSN 1820-7421, 0.912).

3. Milutinović M., Šiler-Marinković S., Antonović D., **Mihajlovski K.**, Pavlović M., Dimitrijević Branković S.: *Antioksidativna Svojstva Sušenih Ekstrakata Iz Otpadne Espresso Kafe*. *Hemijska Industrija*, Vol 67, No 2, **2013**, pp. 261-267, (ISSN 0367-598X, IF 0.562).

4. Pecarski D., Knežević-Jugović Z., Dimitrijević-Branković S., **Mihajlovski K.**, Janković S.: *Preparation, Characterization And Antimicrobial Activity Of Chitosan Microparticles With Thyme Essential Oil*, *Hemijska Industrija*, Vol 68, No 6, **2014**, pp. 721-729 (ISSN 0367-598, IF 0.364).

5. **Mihajlovski K.**, Davidović S., Carević M., Radovanović N., Šiler-Marinković S., Rajilić-Stojanović M., Dimitrijević-Branković S.: *Carboxymethyl Cellulase Production From Paenibacillus sp.*, *Hemijska Industrija*, **2015** OnLine-First (00): 38-38, DOI: 10.2298/HEMIND150222038M (ISSN 0367-598X; IF 0.364)

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini, (**M33**):

1. Djukić-Vuković A., Mojović Lj., Nikolić S., Pejin J., Kocić-Tanackov S., **Mihajlovski K.**: *Distillery Stillage as a New Substrate for Lactic Acid Production in Batch and Fed-batch Fermentation*, *Chemical Engineering Transactions*, Vol 34, **2013**, pp. 97-102, DOI: 10.3303/CET1334017

2. Buntić A., Pavlović M., Šiler-Marinković S., Miljković M., Davidović S., **Mihajlovski K.**, Dimitrijević Branković S.: *Screening For Factors Affecting Cellulose Adsorption From Solutions By Modified Coffee Residues*. *International Conference On Civil, Biological And Environmental Engineering (CBEE)*, Istanbul **2014**, pp. 54-59, ISBN: 978-93-82242-94-9

3. **Mihajlovski K.**, Miljković M., Mladenović D., Dimitrijević-Branković S., Šiler-Marinković S.: *Sugar Beet Pulp And Molasses As A Solid State Fermentation Media For Cellulase Production By Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *Zbornik radova sa međunarodne konferencije XXIII Ekološka istina, Kopaonik* **2015**, str. 403-408.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu,(M34)

4.**Mihajlovski K.**, Pavlović M., Milutinović M., Šiler-Marinković S., Dimitrijević-Branković S.: *Effect Of Fermentation ByStreptomyces sp. On Atioxidant Properties Of Spent Coffee Extracts*. CEFOOD, Novi Sad**2012**, p. 424, ISBN: 978-7994-028-5.

5.**Mihajlovski K.**, Davidović S., Miljković M., Rajilić- Stojanović M., Dimitrijević-Branković S.: *Cellulolytic Potencial Of A StrainPaenibacillus sp. Isolated From Soil*,International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries - ICOSECS 8, Belgrade **2013**, p. 244, ISBN 978-86-7132-053-5.

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja,(M51):

1. Pecarski D., Knežević-Jugović Z., Dimitrijević-Branković S., **Mihajlovski K.**,Janković S.:*Comparative Analysis Of The Chemical Composition And Antimicrobial Activities Of Some Of Lamiaceae Family Species And Eucaliptus (Eucaliptus globules M)*, APTEFF, Vol 45,**2014**, pp. 201-213.

Saopštenje sa nacionalnog skupa štampano u celini,(M63):

1. Dimitrijević Branković S., Pavlović M., Buntić A., Randelović M., **Mihajlovski K.**, Rajić N., Antonović D., Šiler-Marinković S.: *Determination Of The Natural Zeolite Capacity For The Adsorptive Removal Of Crystal Violet Dye From Aqueous Solution Using Response Surface Method*, 50. Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, Beograd **2012**,pp. 132-136. ISBN 978-86-7132-049-8.

1.3. Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Kandidat mr Katarina Mihajlovski, dipl. inž. je završila magistarske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 10.0. Na osnovu dosadašnjeg rada i pokazanih rezultata dosadašnjih istraživanja u oblasti Biohemijskog inženjerstva i biotehnologije, a naročito u oblasti produkcije mikrobnih enzima na otpadnim sirovinama, kao i broja i kvaliteta objavljenih radova, komisija ocenjuje da je mr Katarina R. Mihajlovski, dipl.inž. tehnologije, pokazala sklonost, samostalnost i izrazitu sposobnost za obavljanje naučno-istraživačkog rada, te da je podobna za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

2. Predmet i cilj istraživanja

Industrijska prerada poljoprivrednih biljnih sirovina generiše velike količine otpada na godišnjem nivou. Jedan deo ovog otpada se koristi kao sekundarna sirovina u proizvodnji stočne hrane, međutim, ne ispunjavaju sve sekundarne sirovine standarde kvaliteta i bezbednosti za ovu namenu. Zbog toga se dobar deo agroindustrijskog otpada zbrinjava nekim od dostupnih tehnologija za uništavanje. Smanjena ekonomičnost ovakvog pristupa zbrinjavanja agroindustrijskog otpada ogleda se, pre svega u skraćenju životnog ciklusa osnovnih sirovina ali i u troškovima primenjenih tehnologija za zbrinjavanje. Iz tih razloga,

kao i zbog težnje da se maksimalno iskoriste primarne sirovine i time smanji potrošnja prirodnih resursa, veliko interesovanje za ponovnu upotrebu ovakvog otpada je sve izrazitije. Ekonomski aspekt primene otpadnih sirovina je veoma opravdan. One se mogu koristiti kao jeftina polazna sirovina za proizvodnju drugih vrednih proizvoda. Sa ekološke strane, upotrebom otpadnih sirovina se može postići smanjenje organskog opterećenja ali i smanjenje zagađujućeg uticaja nekih od njihovih komponenti kao što su polifenoli ili druga toksična jedinjenja, prilikom njihovog ispuštanja u prirodu.

Agro-industrijski otpad se uglavnom sastoji od hemiceluloze, celuloze i lignina pa se shodno tome ovaj otpad naziva "lignoceluloznim otpadom". Pored lignoceluloze sadrži i određene količine proteina i mineralnih materija pa se može razmatrati kao pogodna sirovina u nekim biotehnološkim procesima, posebno za proizvodnju mikrobnih enzima kao što su celulaze i amilaze. Proizvodnja ovih enzima na komercijalnim supstratima zahteva značajne investicije i zbog toga se teži ka korišćenju jeftinijih sirovina. U tom smislu, industrije koje generišu biljni otpad mogu biti značajan izvor sekundarnih sirovina za proizvodnju mikrobnih enzima iz grupe celulaza i amilaza. Kao primeri, mogu se navesti biljni otpad koji zaostaje nakon prerade lekovitog bilja, piljevina koja zaostaje nakon obrade drveta pa i otpadne vode bogate skrobom ili celulozom koje nastaju iz industrije prerade papira i kartona. Sekundarne sirovine iz industrije prerade šećerne repe kao što su repin rezanac i melasa, već su našle primenu u biotehnološkim industrijskim procesima i mogu takodje biti korišćene za proizvodnju mikrobnih enzima. Godišnje količine navedenih grupa biljnog otpada su značajne (mogu iznositi hiljade tona) što dovodi do problema njihovog privremenog skladištenja pre odlaganja.

Predmet rada ove doktorske disertacije jeste iskorišćenje otpadnih sirovina, poljoprivrednog i industrijskog porekla, za produkciju enzima celulaza i amilaza uz pomoć novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1.

Glavna komponenta lignoceluloznih sirovina je celuloza. Celuloza je najrasprostranjeniji prirodni polisaharid koji se koristi kao obnovljivi izvor ugljenih hidrata za proizvodnju bioloških proizvoda (enzima) i bioenergije. Celulaze su enzimi koji se sastoje od najmanje tri grupe: endoglukanaza, egzoglukanaza i β -glukozidaze čijim sinergističkim delovanjem se oslobađa glukoza kao glavni proizvod hidrolize celuloze. Mikrobne celulaze nalaze svoju primenu u različitim industrijama: poljoprivrednoj, prehrambenoj, industriji detergenata, prerade pulpe i papira, tekstilnoj industriji, u biorafinirijama za produkciju bioetanola i slično. S obzirom da životinje ne sintetišu enzim celulazu, a ishrana im se bazira na celuloznoj hrani, jedna od najvažnijih primena celulaza je u industriji stočne hrane.

Pored celuloze, poljoprivredni otpad kao i neke vrste industrijskog otpada (otpadne vode) sadže i polisaharid skrob čijom razradnjom pomoću enzima amilaza nastaju vredni proizvodi - glukoza, maltoza i malto-oligosaharidi. Najšira primena amilaza je u skrobnoj industriji, zatim u prehrambenoj za proizvodnju maltoze i maltoznih sirupa, u tekstilnoj industriji, u industriji detergenata i u industriji proizvodnje bioetanola.

Enzim celulaza može biti različitog porekla – biljnog i mikrobnog dok enzim amilaza može biti biljnog, životinjskog ili mikrobnog. Međutim, najznačajniji su mikrobni postupci proizvodnje celulaza i amilaza, zbog jednostavnosti kontrole procesa, velike brzine rasta i razmnožavanja mikroorganizama, visoke aktivnosti i stabilnosti dobijenih enzima.

U prvom delu doktorske disertacije biće prikazan postupak izolovanja i identifikacije novog bakterijskog soja *P. chitinolyticu* CKS1 pomoću 16S rRNA sekvence gena. *P.*

chitinolyticus CKS1 je nov prirodni zemljišni izolat čiji enzimski potencijal ukazuje na mogućnost njegovog korišćenja u proizvodnji celulaza i amilaza.

Tokom poslednjih decenija, sve više pažnje se poklanja biokonverziji otpadnih sirovina pomoću mikroorganizama i dobijanju biotehnoloških vrednih proizvoda iz istih. Za procese konverzije lignoceluloznog otpadnog materijala uglavnom se koriste plesni i bakterije, odnosno njihovi enzimski sistemi. Izolacija, skrining i selekcija novih potentnih celulolitičkih sojeva je omogućila otkrivanje nekoliko novih celulolitičkih mikroorganizama (bakterija) izolovanih iz različitih prirodnih staništa. Nove bakterije producenti celulaza pripadaju vrstama rodova *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus* i *Brevibacillus*. Kod većine komercijalnih celulaza, detaljno su opisani uslovi njihove produkcije posebno za karboksimetilcelulaze (CMC-aze) koje pripadaju grupi endonukleaza, odnosno raskidaju β -1,4-glukozidne veze unutar molekula CMC. Produkcija Avicel-aza, odnosno, egzoglukanaza (ili 1,4- β -D glukan celobiohidrolaza), koje deluju na molekule kristalne celuloze i oslobađaju disaharid celobiozu, bilo sa redukujućeg ili neredukujućeg kraja lanca celuloze, je manje zastupljena kod navedenih bakterija. Enzimski potencijal soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 ukazuje na to da ova bakterija može proizvoditi oba tipa enzima i CMC-aze i Avicel-aze što do sada nije evidentirano u dostupnoj literaturi.

Za komercijalnu proizvodnju amilaza koriste se uglavnom plesni iz roda *Aspegillus* i bakterije roda *Bacillus*. Kod amilaza mikrobnog porekla treba posebno izdvojiti proizvodnju β -amilaza. Većina mikroorganizama uglavnom proizvodi α -amilaze (dok su producenti β -amilaze mnogo redji. β -amilaze su posebno interesantne jer se njihovim delovanjem na skrob (hidroliza skroba) oslobađa maltoza koja predstavlja vredan biotehnološki proizvod i ima primenu u prehrambenoj industriji. Prema najnovijem Bergey-ovom priručniku identifikacije bakterija iz grupe *Firmicute*, neke vrste roda *Paenibacillus* mogu proizvoditi amilolitičke enzime ali to nije karakteristika vrste *Paenibacillus chitinolyticus*. Međutim, preliminarna ispitivanja enzimskog potencijala soja CKS1 ukazuje na njegovu sposobnost produkcije oba tipa amilaza, za šta trenutno nema informacija u dostupnoj literaturi.

U ovom doktorskom radu će se, nakon detaljnog skrininga i utvrđivanja sposobnosti proizvodnje navedenih enzima, izvršiti optimizacija sastava hranljivih podloga, uz dodatak otpadnih sirovina, i uslova gajenja soja CKS1 u cilju poboljšanja produkcije enzima celulaza i amilaza. Radi bolje preglednosti doktorske disertacije, prvo će biti prikazana ispitivanja vezana za produkciju enzima celulaza, a zatim amilaza. Proizvodnja obe grupe enzima će se ispitivati na komercijalnim tečnim supstratima i otpadnim sirovinama. Prikazaće se ispitivanja optimizacije procesa gajenja bakterija u cilju maksimalne produkcije enzima. Posebna grupa ispitivanja će se baviti karakterizacijom enzima, ispitivanjem njihovih temperaturnih i pH opsega aktivnosti, ispitivanjem stabilnosti, kao i uticajem metalnih jona na aktivnost enzima. Proizvodi hidrolize celuloze i skroba će biti kvantifikovani tečnom hromatografijom visokih performansi, a sami enzimi će se prečišćavati tehnikom jonoizmenjivačke hromatografije.

U odredjenim eksperimentima će se primeniti programi za dizajniranje eksperimenta i statističku obradu eksperimentalnih podataka (Design Expert, ver. 8) radi sticanja uvida u uticaj pojedinačnih i međusobnih faktora na produkciju i aktivnost enzima.

Ispitaće se i mogućnost produkcije navedenih enzima gajenjem soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na čvrstim supstratima i optimizovaće se osnovni parametri ovog procesa u cilju postizanja maksimalne produkcije enzima.

Publikovan je veliki broj radova koji se bave produkcijom enzima na otpadnim sirovinama i ovde su navedeni samo neki koji literaturno podržavaju ovu oblast:

1. Lynd, L. R., Van Zyl W. H., McBride J. E., Laser M.: *Consolidated Bioprocessing Of Cellulosic Biomass: An Update*. Current Opinion In Biotechnology, Vol 16, No 5, 2005, pp. 577-583.
2. Maki, M., Leung K. T., Qin W.: *The Prospects Of Cellulase-Producing Bacteria For The Bioconversion Of Lignocellulosic Biomass*. International Journal of Biological Sciences, Vol 5, No 5, 2009, pp. 500-516.
3. Kumar, R., Singh S., Singh O. V.: *Bioconversion Of Lignocellulosic Biomass: Biochemical And Molecular Perspectives*. Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology, Vol 35, No 5, 2008, pp. 377-391.
4. Miller, G. L.: Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, Vol 31, No 3, 1959, pp. 426-428.
5. Zhang, Y.-H. P., Himmel, M. E. Mielenz J. R.: *Outlook For Cellulase Improvement: Screening And Selection Strategies*. Biotechnology Advances, 24, No 5, 2006, pp. 452-481.
6. Pandey, A., Nigam P., Soccol C., Soccol V., Singh D., Mohan R.: *Advances In Microbial Amylases*. Biotechnology and Applied Biochemistry, Vol 31, No 2, 2000, pp.135-152.
7. Pandey, A., Selvakumar P., Soccol C. R., Nigam P.: *Solid State Fermentation For The Production Of Industrial Enzymes*. Current Science, Vol 77, No 1, 1999, pp.149-162.
8. Mussatto, S. I., Teixeira J. A., Ballesteros L. F., Martins S.: *Use Of Agro-Industrial Wastes In Solid-State Fermentation Processes*. INTECH Open Access Publisher, 2012, pp. 121-139. ISBN 978-953-51-0253-3
9. Nigam, P. S., Pandey A.: *Solid-State Fermentation Technology For Bioconversion Of Biomass And Agricultural Residues*. In Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation, 2009, pp.197-221. Springer.
10. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K., Chauhan B.: *Microbial α -Amylases: A Biotechnological Perspective*. Process Biochemistry, Vol 38, No 11, 2003, pp.1599-1616.
12. Van Der Maarel M. J., Van Der Veen B., Uitdehaag J., Leemhuis H., Dijkhuizen L.: *Properties And Applications Of Starch-Converting Enzymes Of The α -Amylase Family*. Journal Of Biotechnology, 94, 2002, pp. 137-155.
13. Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K. M., Sukumaran R. K., Pandey A.: Response Surface Methodology For The Optimization Of Alpha Amylase Production By *Bacillus amyloliquefaciens*. Bioresource Technology, Vol 99, No , 2008, pp. 4597-4602.
14. Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D.: *New Developments In Solid State Fermentation: I- Bioprocesses And Products*. Process Biochemistry, Vol 35, No 10, 2000, pp. 1153-1169.
15. Babu K., Satyanarayana T. *α -Amylase Production By Thermophilic *Bacillus coagulans* In Solid State Fermentation*. Process Biochemistry, Vol 30, No 4, 2000, pp. 305-309.
16. Saxena, R.K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P.: *A Highly Thermostable And Alkaline Amylase From *Bacillus* sp. PN5*. Bioresource Technology, Vol 98, No 2, 2007, pp. 260-265.
17. Prakash, O., Jaiswal N.: *α -Amylase: An Ideal Representative Of Thermostable Enzymes*.

- Applied Biochemistry And Biotechnology, Vol 160, No 8, 2010, pp. 2401-2414.
18. Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Fava, F. : *Halo-Alkalitolerant And Thermostable Cellulases With Improved Tolerance To Ionic Liquids And Organic Solvents From Paenibacillus tarimensis Isolated From The Chott El Fejej, Sahara Desert, Tunisia*. Bioresource Technology, Vol 150, 2013, pp. 121-128.
 19. Kumar, D., Ashfaque, M., Muthukumar, M., Singh, M., Garg, N.: Production And Characterization Of Carboxymethyl Cellulase From *Paenibacillus polymyxa* Using Mango Peel As Substrate. Journal of Environmental Biology, Vol 33, 2012, pp. 81-84.
 20. Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., Balasubramanian, T.: *Thermostable, Haloalkaline Cellulase From Bacillus halodurans CAS 1 By Conversion Of Lignocellulosic Wastes*. Carbohydrate Polymers, Vol 94, No1, 2013, pp. 409-415.
 21. Rezić, T. I., Marković, I., Ludwig, R.: *Integrated Hydrolyzation And Fermentation Of Sugar Beet Pulp To Bioethanol*. Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol 23, 2013, pp. 1244-1252.
 22. Ikram-Ul-Haq, U. H., Mahmood, Z., Javed, M. M.: *Solid State Fermentation For The Production Of α -amylase By Paenibacillus amylolyticus*. Pakistan Journal of Botany, Vol 44, 2013, pp. 341-346.
 23. Cotârlet, M.: *Medium Optimization For The Production Of Cold-Active Beta Amylase By Psychrotrophic Streptomyces MIUG 4 Alga Using Response Surface Methodology*. Microbiology, Vol 82, No 2, 2013, pp. 147-154.

3. Polazne hipoteze

Prva polazna hipoteza ove doktorske disertacije bazira se na pretpostavci da novi prirodni zemljišni bakterijski soj *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 poseduje potencijal za produkciju enzima celulaza i amilaza.

Druga polazna hipoteza uključuje pretpostavku da se pomoću ovog mikroorganizma mogu efikasno tretirati različiti otpadni nus-proizvodi agroindustrije u cilju proizvodnje vrednih biotehnoloških proizvoda kao što su enzimi iz grupa celulaza i amilaza. Kako su celulaze i amilaze inducibilni enzimi, pretpostavka je da se pravilnom selekcijom, kombinovanjem i optimizacijom sastava hranljivih podloga kao i uslova gajenja, mogu postići zadovoljavajući prinosi sintetisanih enzima uz postizanje ekonomske opravdanosti.

Treća polazna hipoteza se zasniva na činjenici da enzimi iz grupe celulaza i amilaza imaju širok spektar primene u različitim industrijama. Da bi se sagledao potencijal primene enzima dobijenih u okviru ove doktorske teze, potrebno je izvršiti njihovu karakterizaciju, izolaciju iz fermentacionog medijuma kao i njihovo prečišćavanje. U okviru karakterizacije, standardni postupci obuhvataju određivanje opsega i/ili optimalnih vrednosti temperature i pH za ispoljavanje aktivnosti. Pored toga, poželjno je ispitati njihovu stabilnost u širem temperaturnom i pH opsegu kao i uticaj različitih jona na istu. Da bi se konkretnije sagledala mogućnost primene dobijenih enzima, poželjno je ispitati potencijal saharifikacije lignocelulozne biomase i skrobnog materijala. To bi otvorilo mogućnost njihove primene u proizvodnji biogoriva, za dobijanje vrednih biotehnoloških proizvoda poput celobioze,

maltoze i slično ili kao enzimskih preparata za različite grane prehrambene industrije (na primer, za industriju piva).

4. Naučne metode istraživanja

Proizvodni mikroorganizam je izolovan, prečišćen i identifikovan kao *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 na osnovu skoro potpune dužine 16S rRNA sekvence gena. Prvi skrining na produkciju celulaza i amilaza će biti izvršen uzgajanjem mikroorganizma na selektivnom medijumu koji sadrži karboksimetil celulozu i skrob.

Proizvodnja enzima, pomoću soja CKS1 će se vršiti postupkom submerznog gajenja kao i postupkom gajenja na čvrstom supstratu (SSF – solid state fermentation). Koristiće se komercijalne podloge za gajenje kao i podloge sa otpadnim nus-proizvodima koji sadrže lignoceluloznu biomasu i skrob.

Za praćenje procesa fermentacije koristiće se standardne mikrobiološke i analitičke metode. Enzimska aktivnost će se ispitivati standardnom metodom sa di-nitrosalicilnom kiselinom (DNS metoda). Za optimizaciju procesa proizvodnje željenih enzima i statističku analizu podataka, koristiće se programski paket Design Expert 8 (Stat-Ease, Inc.). Ispitivaće se uticaji uslova gajenja bakterijske kulture kao i sastav podloga, posebno sa aspekta određivanje udela nus-proizvoda u podlozi.

Pratiće se aktivnost sledećih tipova enzima: a) celulaznih - karboksimetil celulaza (CMC-aza), Avicel-aza i FP-aza (aktivnost celulaza na filter papiru, što ukazuje na sposobnost hidrolize i kristalnih i amorfnih regija celuloze); b) amilolitičkih – α -amilaza i β -amilaza.

Za karakterizaciju enzima, pored standardnih metoda određivanja temperaturnih i pH opsega, određivaće se temperaturna i pH stabilnosti enzima i uticaj pojedinih jona na aktivnost. Veličina, odnosno molekulska masa enzima, će biti određena metodom native i SDS-PAGE elektroforeze, korišćenjem komercijalnih standarda.

U cilju određivanja produkata hidrolize lignoceluloznog i skrobnog materijala, koristiće se tečna hromatografija visokih performansi korišćenjem C18 reversnofazne kolone u odgovarajućim uslovima.

Skenirajuća elektronska mikroskopija će se koristiti za pružanje informacija o potvrđivanju imobilizacije ćelija *P. chitinolyticus* CKS1 na supstratima koji se koriste u podlozi za proizvodnju enzima.

5. Aktuelnost problematike u svetu i očekivani naučni doprinos

Rezultati koji proisteknu iz rada na ovoj doktorskoj disertaciji mogu predstavljati značajan doprinos iskorišćenja otpadnih sirovina za proizvodnju enzima. Dobijeni enzimi mogu imati potencijalnu industrijsku primenu u postupcima dobijanja vrednih biotehnoloških proizvoda. Uzimajući u obzir da je proizvodnja enzima veoma skupa, uglavnom zbog skupih podloga za mikrobne fermentacije, korišćenje jeftinih, otpadnih sirovina se svakako preporučuje. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji mogu biti od velikog značaja kod primene celulaza u industrijske svrhe, posebno kod saharifikacije lignocelulozne biomase i procese dobijanja bioetanola.

Po završetku predloženih ispitivanja očekuju se sledeći pojedinačni naučni doprinosi:

- izolacija novog bakterijskog soja pogodnog za produkciju enzima celulaza i amilaza;
- razvoj mikrobiološke proizvodnje novih celulolitičkih enzima, pre svega Avicel-aza na otpadnim sirovinama, odnosno na lignoceluloznoj biomasi;
- razvoj mikrobiološke proizvodnje enzima β -amilaza na otpadnoj vodi sa povećanim sadržajem skroba kao i na melasi i repinom rezancu;
- optimizacija parametara procesa fermentacije i sastava hranljive podloge pri mikrobiološkoj produkciji enzima celulaza;
- optimizacija parametara procesa fermentacije pri mikrobiološkoj produkciji enzima β -amilaza;
- karakterizacija proizvedenih celulaza i amilaza uz sagledavanje mogućnosti njihove industrijske primene.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Predmet rada ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti iskorišćenja otpadnih sirovina, poljoprivrednog i industrijskog porekla, za produkciju enzima celulaza i amilaza uz pomoć novog bakterijskog izolata *P. chitinolyticus* CKS1. Osnovni cilj ovog istraživanja jeste proizvesti enzim, pomoću mikroorganizma, na otpadnoj sirovini i dobiti biotehnološki vredan proizvod iz istih. U toku rada na disertacije predviđene su sledeće faze i aktivnosti u istraživanju:

1. Izvršiće se izolovanje, prečišćavanje i identifikacija novog bakterijskog soja, prirodnog zemljišnog izolata, *P. chitinolyticus* CKS1 sa ciljem da poseduje sposobnost proizvodnje enzima celulaza i amilaza željenih karakteristika.
2. Ispitaće se uticaj osnovnih parametara na biosintezu enzima, kao što su uticaj pasažiranja mikroorganizma, vreme inkubacije, uticaj pH medijuma, uticaj različitih izvora ugljenika, uticaj različitih izvora azota i uticaj različitih zapremina medijuma i brzine mešanja.
3. U cilju određivanja potencijalne primene proizvedenih enzima, ispitaće se i uticaj temperature, pH i različitih jona na aktivnost i stabilnost proizvedenih enzima.
4. Kako bi se sagledale mogućnosti industrijske primene, odrediće se proizvodi hidrolize celuloze i skroba, pojedinačnim delovanjem celulaza i amilaza na ispitivane supstrate.

Predviđa se da će u doktorskoj disertaciji biti obrađena sledeća poglavlja: *Uvod*, *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija*, *Zaključak*, *Literatura*.

U poglavlju *Uvod* biće definisani glavni ciljevi disertacije, predmet istraživanja i doprinos disertacije.

Teorijski deo doktorske disertacije obuhvatiće analizu prethodnih istraživanja koja se odnose na:

- agroindustrijski i industrijski otpad;
- mogućnost iskorišćenja lignocelulozne biomase za produkciju celulaza;
- celulaze i njihova svojstva;
- mikrobiološku proizvodnju celulaza (izvori celulolitičkih enzima i celulaze za biokonverziju);
- industrijsku primenu celulaza;
- otpadne sirovine bogate skrobom i šećerima za produkciju amilaza;

- amilaze i njihova svojstva;
- mikrobiološku proizvodnju amilaza (uticaj različitih faktora na produkciju amilaza);
- industrijsku primenu amilaza (primena β -amilaza za produkciju maltoznih sirupa).

U *Eksperimentalnom delu* biće navedene metode korišćene u eksperimentalnom radu:

- materijali i hemikalije korišćene u radu;
- opis eksperimentalnih tehnika izolacije, prečišćavanja i identifikacije radnog mikroorganizma;
- opis eksperimentalnih tehnika za ispitivanje celulolitičke i amilolitičke aktivnosti datog mikroorganizma;
- opis eksperimenata za produkciju celulaza (CMC-aza) na komercijalnim podlogama;
- opis eksperimenata za produkciju celulaza (Avicelaza) na otpadnim sirovinama;
- eksperimentalni plan optimizacije produkcije amilaza na otpadnim sirovinama;
- opis izvođenja metode skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) za potvrdu o imobilizaciji ćelija mikroorganizma na repinom rezancu;
- opis eksperimenata za karakterizaciju celulaza i amilaza;
- opis tehnika za identifikaciju krajnjih produkata hidrolize celuloze;
- opis eksperimentalnih tehnika za izolaciju i prečišćavanje celulaza i amilaza.

U okviru *Rezultata i diskusije* biće predstavljeni i diskutovani rezultati istraživanja. Detaljno će biti prodiskutovani rezultati vezani za proizvodnju celulaza kako na komercijalnim tako i na otpadnim sirovinama. Kvantitativno će se razmatrati uticaj parametara fermentacije na proizvodnju celulaza. Posebno će biti diskutovani rezultati produkcije Avicel-aza na lignoceluloznoj biomasi. Rezultati proizvodnje β -amilaza na otpadnoj vodi iz industrije prerade kartona biće detaljno prodiskutovani zajedno sa rezultatima optimizacije procesa proizvodnje β -amilaza na melasi i repinom rezancu. Kvantitativno će se razmatrati uticaji procesnih parametara na količinu proizvedenih enzima i njihove međusobne interakcije. Diskutovaće se i svojstva proizvedenih celulaza i amilaza sa mogućnošću primene u industrijske svrhe. Diskusija će obuhvatiti i poređenje krajnjih produkata hidrolize celuloze i skroba sa dostupnim literaturnim podacima.

U *Zaključku* će biti sumirani dobijeni rezultati, izvedeni na osnovu izvršenih ispitivanja. *Literatura* će sadržati navode citirane u disertaciji, kao i radove proistekle istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije.

7. Zaključak i predlog

Na osnovu izloženog, Komisija smatra da je tema predložene doktorske disertacije pod naslovom: „Poljoprivredni i industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju celulaza i amilaza pomoću novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1“, koju je predložila mr Katarina R. Mihajlovski, dipl. inž., naučno zasnovana i da predstavlja značajan naučni doprinos naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova. Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu da kandidatu mr Katarini R. Mihajlovski odobri izradu doktorske disertacije pod navedenim naslovom. Za mentora pri izradi doktorske disertacije predlaže se dr. Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 05.10.2015.

ČLANOVI KOMISIJE

prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

prof. dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

prof. dr Dejan Bezbradica, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

Dr. Mirjana Rajilić-Stojanović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-Metalurški fakultet

prof. dr Anita Klaus, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet