

ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ
ФАКУЛТЕТ
35/146
(Број захтева)

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

12.04.2019.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду („Гласник Универзитета“, број 131/06), дате сагласност на предлог теме докторске дисертације:

„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus* (Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.)“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

ABDALLA ALI SALIM, мастер инжењер технологије

2. Назив и седиште факултета на коме је стекао основно образовање: Ректор Универзитета у Београду донео је Решење број 06-61301-5990/3-13 од 20.12.2013. године о признавању високошколске исправе стечене на Универзитету у Мисурати, Либија, из 2009. Године, чиме је стекао право на наставак образовања на Универзитету у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

3. Година дипломирања: /

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

5. Година дипломирања: 2014.

Студент је уписан на докторске академске студије школске 2014/2015. године.

Обавештавамо Вас да је Наставно-научно веће, на седници одржаној 11.04.2019. године размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Петар Ускоковић

Прилог:

1. Предлог теме докторске дисертације са образложењем
2. Акт надлежног тела факултета о подобности теме за израду докторске дисертације
3. Подаци о ментору.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

за кандидата: **Abdalla Ali Salim**

Име и презиме: Зорица Кнежевић-Југовић

Звање: редовни професор

Списак радова објављених у научним часописима са Science Citation Index (SCI) листе који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Đurović, S., Nikolić, B., Luković, N., Jovanović, J., Stefanović, A., Šekuljica, N., Mijin, D., **Knežević-Jugović, Z.**, The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds (2018) *Industrial Crops and Products*, 122, pp. 223-231. ISSN: 0926-6690; IF (2017) 3,849.
2. Salim, A.A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., **Knežević-Jugović, Z.** Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods (2017) *Bioresource Technology*, 228, pp. 193-200. ISSN: 0960-8524; IF(2017) 5,807.
3. **Knežević-Jugović, Z.D.**, Žuža, M.G., Jakovetić, S.M., Stefanović, A.B., Džunuzović, E.S., Jeremić, K.B., Jovanović, S.M. An approach for the improved immobilization of penicillin G acylase onto macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) as a potential industrial biocatalyst (2016) *Biotechnology Progress*, 32 (1), pp. 43-53. ISSN: 8756-7938; IF(2015) 2,167.
4. Smelcerović A., **Knežević-Jugović, Z.**, Petronijević, Z., Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals (2008) *Current Pharmaceutical Design*, 14 (29), pp. 3168-3195. ISSN 1381-6128 IF(2008) 4,399.
5. Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadžić, I., **Knežević-Jugović, Z.** Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance (2011) *Bioresource Technology*, 102 (24), pp. 11226-11233. ISSN: 0960-8524; IF(2011) 4,980.

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

Ⓐ) У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, 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 односно 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: 08.04.2019.

М.П.

Проф. др Петар Ускоковић

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл. 31. и 32 Правилника о докторским студијама ТМФ-а, на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 11.04.2019. 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 **Abdalla Ali Salim**, мастер инжењеру, под називом: „**Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus* (Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.)**“

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

Одобрава се студенту да докторску дисертацију пише и брани на енглеском језику.

За ментора се одређује др Зорица Кнежевић Југовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

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

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Predmet: Podobnost teme i kandidata Abdalla Ali Salim, master inž., za izradu doktorske disertacije

Odlukom Nastavno-naučnog veća Tehnološko-metalurškog fakulteta br. 35/39 od 31.01.2019. godine, imenovani smo za članove Komisije za ocenu podobnosti teme i kandidata **Abdalla Ali Salim, master inž.**, za izradu doktorske disertacije i naučne zasnovanosti teme pod nazivom:

**„Proizvodnja hidrolitičkih enzima fermentacijom na poljoprivrednom otpadu pomoću različitih vrsta iz roda *Bacillus*“
(„Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.“)**

Na osnovu materijala priloženog uz Zahtev kandidata, Komisija podnosi sledeći

REFERAT

1. Podaci o kandidatu

1.1. Biografski podaci

Abdalla Ali Salim, master inž., rođen je 12.04.1985.godine u Misrati u Libiji, gde je završio osnovnu i srednju školu. Studije na Univerzitetu Misrata (Science Faculty) završio je školske 2009. godine. Master akademske studije, na Tehnološko-metalurškom fakultetu, na katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologije završio je 2014. godine odbranivši master rad pod nazivom: *“Uticaj vrste pretretmana na hidrolizu belanceta katalizovanu proteazom iz *Bacillus licheniformis* – kinetika procesa i matematičko modelovanje”*.

Doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2014/2015. na odseku za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Položio je sve ispite predviđene nastavnim planom doktorskih studija sa prosečnom ocenom od 9,64.

Spisak položenih ispita na doktorskim studijama:

Naziv predmeta	ESBN	Ocena
Odabrana poglavlja biohemije-vitamini	5	10
Odabrana poglavlja matematičke analize	5	10
Industrijska mikrobiologija	5	10
Biohemijska kinetika	5	10
Hemijska kinetika	5	8
Viši kurs elektrohemijaskog inženjerstva	6	8

Sanitarna mikrobiologija	4	10
Elektrodi materijali	5	10
Elektrohemijski i alternativni izvori električne energije	5	10
Odabrana poglavlja tehnologije mikrobne biomase	5	10
Završni ispit	30	10
Ukupno	80	9,64

Govori arapski i engleski jezik. Završio je nekoliko Microsoft Windows kurseva. Kao koautor objavio je jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i jedan rad u međunarodnom časopisu (M23).

Spisak objavljenih radova:

Naučni radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M20)

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. **Salim A.A.**, Grbavčić S., Šekuljica N., Stefanović A., JakovetićTanasković S., Luković N., Knežević-Jugović Z., Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods, *Bioresource Technology*, Vol 228, 2017, pp 193-200.ISSN 0960-8524, IF(2017) 5,807, 13/161 *Biotechnology & Applied Microbiology*.

Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

1. **Salim A.A.**, Grbavčić S., Šekuljica N., Vukašinović-Sekulić M., Jovanović J., Jakovetić Tanasković S., Luković N., Knežević-Jugović Z., Enzyme production by solid-state fermentation on soybean meal: a comparative study of conventional and ultrasound-assisted extraction methods, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, doi 10.1002/bab.11732, ISSN: 0885-4513, IF (2017) 1,440, 122/161 *Biotechnology & Applied Microbiology*.

1.2. Ocena podobnosti kandidata za rad na predloženoj temi

Uzimajući u obzir dosadašnji rad i rezultate ostvarene tokom naučno-istraživačkog rada, Abdalla Ali Salim, master inž., pokazao je interes, sklonost i sposobnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Iz oblasti istraživanja, iz koje se predlaže tema doktorske disertacije, do sada je objavio dva naučna rada u međunarodnim časopisima. Kandidat poseduje i odlično znanje engleskog i ima iskustva u korišćenju različitih eksperimentalnih tehnika kao i nekoliko softverskih paketa za obradu podataka.

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da Abdalla Ali Salim, master inž., ispunjava sve potrebne uslove za rad na predloženoj temi doktorske disertacije.

2. Predmet i cilj naučog istraživanja

Istraživanja u okviru predložene doktorske disertacije biće usmerena na razvoj novih održivih biotehnoških procesa na bazi korišćenja agro-industrijskih otpadnih tokova ili nus-proizvoda nakon prerade soje, kukuruza, suncokreta za dobijanje proizvoda sa dodatkom

vrednošću. Kako navedeni supstrati imaju varijabilan i vrlo složen hemijski sastav, konverzija svakog pojedinačnog lignoceluloznog ili proteinskog supstrata u proizvod predstavlja poseban izazov, gde je potrebno optimizovati procesne uslove pretretmana i fermentacije i korišćenje nus-proizvoda. Iako su danas postignuti određeni pomaci u konverziji različitih lignoceluloznih i drugih supstrata u proizvode sa dodatnom vrednošću, još uvek postoje brojni nerešeni problemi koji sprečavaju industrijski razvoj. Predložena doktorska disertacija bi se potencijalno bavila najosetljivijim i za sada nerešenim pitanjima u oblasti proizvodnje enzima. Posebno je od značaja odabir proizvodnog mikroorganizma kao i dobijanje novih produktivnih izolata mikroorganizama za biosintezu ekstracelularnih celulaza, mananaza, proteaza, α -amilaza i drugih važnih hidrolitičkih enzima. Naročita pažnja će se usmeriti na izolovanje novih mikroorganizama iz različitih prirodnih staništa i uslova, a posebno termofilnim vrstama. Naime, težnja je izolacija najproduktivnijih i najstabilnijih vrsta sa specifičnim originalnim svojstvima. Povećanje produktivnosti se očekuje manipulacijom mehanizama koji regulišu enzimsku sintezu i uvođenjem odgovarajućih induktora. Ovaj koncept još nije dovoljno ispitan i očekuje se da doprinese naučnom progresu u oblasti.

Celulaze i mananaze su heterogena grupa enzima koja katalizuje hidrolizu 1,4- β -D-glikozidnih veza ili 1,4- β -D- i 1,6- α -D-glikozidnih veza u celulozi, mananima, galaktomananima, glukomananima i obuhvata različite enzime koji se razlikuju po strukturi, specifičnosti i mehanizmu delovanja kao što su celulaze u užem smislu reči (endo 1,4- β -D-glukan glukanohidrolaze, EC 3.2.1.4), egzoglukanaze (egzo 1,4- β -D-glukan celobiohidrolaze, EC 3.2.1.91), β -glukozidaze ili celobiazе (β -D-glukozid glukohidrolaze, EC 3.2.1.21), manan 1,4- β -manobiozidaze (EC 3.2.1.100), manan endo-1,6- α -manozidaze (EC 3.2.1.101), manan endo-1,4- β -D-manozidaze (poznata kao β -mananaza, EC 3.2.1.78), α -manozidaze (EC 3.2.1.24), β -manozidaze (EC 3.2.1.25) i druge. Imaju veliku primenu u poljoprivredi, papirnoj i tekstilnoj industriji, u industriji detergenata, kao i u prehrambenoj industriji pri obradi voća, povrća i industrijskih biljki da bi se unapredila ekstrakcija, smanjila viskoznost i povećali prinosi i kvaliteti različitih proizvoda. Jedan od enzimskih procesa koji je u perspektivi je hidroliza biljne lignocelulozne biomase u cilju dobijanja glukoze kao polazne sirovine za proizvodnju biogoriva, ali za sada ovi procesi su u fazi ispitivanja na nivou pilot postrojenja. Sa druge strane, proteaze i amilaze, pored svoje osnovne uloge da katalizuju redom hidrolizu proteina i skroba, katalizuju i veliki broj drugih hidrolitičkih i sintetskih reakcija, i to uglavnom uz visoku regio- i enantiospecifičnost, što ih čini izuzetno važnim biokatalizatorima u farmaceutskoj, prehrambenoj i hemijskoj industriji. Ipak, visoka cena proizvodnje ovih enzima često je razlog njihove ograničene industrijske primene. Još jedan od problema je prisustvo malog broja komercijalnih celulaza, mananaza i amilaza na tržištu jer veliki broj postojećih enzima nije dovoljno okarakterisan i još uvek se ne proizvode u velikim razmerama ili se proizvode po visokim cenama. Sve veće potrebe i zahtevi tržišta za novim ekološkim proizvodima tačno definisanih svojstava zahtevaju i pronalaženje novih enzima sa tačno određenom specifičnošću, termo- i hemijskom stabilnošću i drugim specifičnostima, koji će omogućiti njihovo dobijanje.

Poslednjih godina raste interesovanje za proizvodnju enzima putem jeftinih postupaka kao što je gajenje mikroorganizma na čvrstim podlogama. Jedan od najvećih razloga za ovakvu ekspanziju jeste mogućnost korišćenja poljoprivrednog otpada kao supstrata za gajenje mikroorganizama. Poljoprivredni i industrijski otpad je veliki zagadjivač životne sredine. Konverzija ovih otpada u korisne proizvode može u velikoj meri da ublaži probleme koje takav otpad prouzrokuje. S druge strane, taj isti otpad predstavlja bogat izvor fermentabilnih šećeraili proteina. Ovo je usmerilo pažnju naučne zajednice prema revalorizaciji ovih otpada u cilju

dobijanja vrednih mikrobioloških metabolita. Osim ekološke prednosti ovakvih postupaka, dobijanje industrijski korisnih enzima, kao vrednog metabolita, značajno smanjuje cenu proizvodnje enzima, samim tim povećavajući mogućnost njihove šire industrijske primene, odnosno čini industrijske enzimske procese konkurentne sa hemijskim. Gajenje mikroorganizama na čvrstim podlogama je jednostavna tehnologija u pogledu procesne opreme, ekonomičan je i potencijalno se mogu ostvariti veći prinosi enzima u optimizovanim i kontrolisanim procesima u poređenju sa fermentacijom u tečnoj podlozi.

Hemijsko-fizička svojstva čvrstog supstrata su najvažniji faktori u procesu proizvodnje enzima gajenjem mikroorganizama na čvrstoj podlozi.. Pored toga, dostupnost supstrata mikroorganizmu, takođe, igra važnu ulogu u toku fermentacije. Ponekad sastav supstrata ne odgovara nutritivnim zahtevima mikroorganizma i onda je neophodno dopuniti podlogu nutritivnim. U nekim supstratima, dostupnost hranjivih materija je loša zbog postojanja kompleksa, na primer proteina i ugljenih hidrata, koji ometaju i ograničavaju pristup enzima i asimilaciju hranjivih materija iz medija. Generalno, takve supstrate treba podvrgnuti nekom vrstom fizičkog ili hemijskog pretretmana. Pretretmani se obično vrše u cilju poboljšanja biodigestibilnosti supstrata degradacijom neprobojnih kompleksa i istovremeno menjaju fizička svojstva supstrata, tj. poroznost, veličinu aglomerata, čime se povećava dostupnost nutritivnih materija mikroorganizmima. Izbor odgovarajućeg pretretmana mora ispuniti nekoliko kriterijuma i mora da se odredi za svaki supstrat, mikroorganizam i/ili željeni enzim. U idealnom slučaju, pretretman ne sme da dovede do značajnog gubitka fermentabilnih nutritivnih materija, ne sme da se koriste toksične hemikalije ili da sam proces dovede do proizvodnje toksičnih jedinjenja. Takođe, prednosti imaju oni protokoli koji imaju minimalni zahtev za energijom, skupom opremom ili hemikalijama. Tradicionalno korišćene metode su kiselinski i bazni pretretmani. Međutim, kao efikasne metode sve više se koriste ultrazvuk visokog intenziteta i mikrotalasi zbog svoje velike učinkovitosti prilikom tretiranja različite vrste biomasa.

Na osnovu pregleda literature, jasno je da su veoma aktuelna ispitivanja koja imaju za cilj valorizaciju različitih sporednih proizvoda i otpadnih tokova industrije prerade voća, soje, kukuruza i suncokreta i drugog poljoprivrednog materijala biotehnološkom 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 kultivšu na čvrstim hranljivim podlogama, pa je došlo do značajnog napretka u toj oblasti. Pronalaženje novih prirodnih sojeva koji produkuju enzime celulolitičkog kompleksa sa unapređenim svojstvima za razgradnju lignocelulozne biomase je takođe sve više predmet aktuelnih istraživanja.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitaće se mogućnost korišćenja nekoliko različitih mikroorganizama kao potencijalnih producenata enzima: celulaza, mananaza, proteaza i amilaza. Nakon primarne selekcije mikroorganizama, izabrani sojevi će biti gajeni na čvrstoj podlozi pri čemu će se koristiti različiti poljoprivredni otpadi (sojina sačma i ljuspice, kukuruzna sačma, pogača masline, pšenična pleva, jabučni trop). Ispitane podloge će biti podvrgnute različitim pretretmanima da bi se utvrdio njihov uticaj na dostupnost hranjivih materija i posledično, na veći prinos sintetisanih enzima. Osim standardnih pretretmana podloge (kiselinski i bazni postupak) ispitaće se i novije metode upotrebe ultrazvuka i mikrotalasa, koje postaju aktuelne metode zbog svoje velike učinkovitosti prilikom tretiranja različite vrste biomasa. Takođe, ispitaće se i različite metode ekstrakcije sintetisanih enzima iz čvrste podloge. Naime, da bi se zadržale prednosti gajenja mikroorganizama na čvrstoj podlozi, kao što su veći prinosi enzima u poređenju sa fermentacijom u tečnoj podlozi, neophodno je optimizovati i postupak

prečišćavanja. Ekstrakcija i prečišćavanje finalnog proizvoda značajno doprinosi ukupnim troškovima proizvodnje, te je od ključnog značaja razvoj efikasnog postupka za ekstrakciju fermentisanih supstrata. Ispitaće se nekoliko faktora kao što su vrsta i količina rastvarača, pH rastvora, brzina mešanja, vreme i temperatura. Takođe, i u ovom koraku će se ispitati uticaj inovativne tehnike ekstrakcije u cilju povećanja koncentracije enzima, kao što je primena ultrazvučne ekstrakcije. Finalno, vršiće se i analiza fermentisane podloge radi evaluacije uticaja proizvodnih mikroorganizama na nutritivni kvalitet fermentacione pogače.

Publikovan je veliki broj radova i patenata koji se bavi ovom tematikom i ovde su navedeni samo neki radovi koji su povezani sa proizvodnjom enzima fermentacijom na poljopivrednom i industrijskom otpadu:

1. Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., Soni, S.K., 2012. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Manage.* 32, 1341–1346.
2. Biz, A., Finkler, A.T.J., Pitol, L.O., Medina, B.S., Krieger, N., Mitchell, D.A., 2016. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 111, 54–62.
3. Couto, S.R., Sanromán, M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *J. Food Eng.* 76, 291–302.
4. Uyar, F., Baysal, Z., 2006. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. *Process Biochem.* 39, 1893–1898.
5. He, Z., Wang, Z., Zhao, Z., Yi, S., Mu, J., Wang, X., 2017. Influence of ultrasound pretreatment on wood physiochemical structure. *Ultrason. Sonochem.* 34, 136–141.
6. Li, P., Xia, J., Shan, Y., and Nie, Z. 2015 Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01 *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 2013–2022
7. Leite P.; Salgado J.M.; Venâncio A.; Domínguez J. M.; Belo I.; 2016 Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.*, 214, 737–746.
8. Szabo O. E.; Csiszar E.; Koczka B.; Kiss K. 2015 Ultrasonically assisted single stage and multiple extraction of enzymes produced by *Aspergillus oryzae* on a lignocellulosic substrate with solid-state fermentation. *Biomass Bioenergy* 75, 161-169.
9. Heffels P.; Weber F.; Schieber A. 2015 Influence of accelerated solvent extraction and ultrasound-assisted extraction on the anthocyanin profile of different *Vaccinium* species in the context of statistical models for authentication. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 7532-7538
10. Chung H.; Ji X.; Canning C.; Sun S.; Zhou K. 2010 Comparison of different strategies for soybean antioxidant extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4508-4512
11. Huang G.; Chen S.; Dai C.; Sun L.; Sun W.; Tang Y.; Xiong F.; He R.; Ma H. 2017 Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrason. Sonochem.* 37, 144–149.
12. Meena P.; Tripathi A.D.; Srivastava S.K.; Jha A. 2013 Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2, 210–216.

13. Diaz, A.B., de Souza Moretti, M.M., Bezerra-Bussoli, C., da Costa Carreira Nunes, C., Blandino, A., da Silva, R., Gomes, E., 2015. Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. *Bioresour. Technol.* 185, 316–323.
14. Afrisham S., Badoei-Dalfard A., Namaki-Shoushtari A., Karami Z. 2016 Characterization of a thermostable, CaCl_2 -activated and raw-starchhydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 132, 98–106.
15. De, A., Mukherjee, S., Sadhukhan, G.C., Saha, N.C. 2018 An insight into the cellulolytic potential of three strains of *Bacillus* spp. Isolated from benthic soil of aquaculture farms in East Kolkata Wetlands, India. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 12 (3), 1597-1605.
16. Siu-Rodas, Y., Calixto-Romo, M.D.L.A., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J.E., Zamora-Briseño, J.A., Amaya-Delgado, L. 2018 *Bacillus subtilis* with endocellulase and exocellulase activities isolated in the thermophilic phase from composting with coffee residues, *Revista Argentina de Microbiologia*, 50 (3), 234-243.

3. Polazne hipoteze

U okviru doktorske disertacije planiraju se sveobuhvatna ispitivanja velikog broja komercijalnih i autohtonih bakterija iz različitih vrsta roda *Bacillus*, kao i različitih pretretmana poljoprivrednih supstrata (ultrazvukom, mikrotalasima), razmatranje parametara pretretmana, sastava hranljive podloge, parametara fermentacionog procesa, dizajna i operativnog režima rada reaktora. Pažnja će se usmeriti na enzime iz ekstremofila i ostalih vrsta iz roda poput *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. toyonensis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*, za koje se očekuje da će imati bolja svojstva. Da bi se postigli maksimalni utrošak supstrata i prinos enzima prilikom proizvodnje enzima tehnikom fermentacije na čvrstim agro-industrijskim otpadnim materijalima, potrebno je optimizovati procesne parametre uključujući temperaturu, sadržaj vlage, veličinu i način pripreme inokuluma, granulaciju supstrata, pretretman i parametre pretretmana. Postupak fermentacije će biti optimizovan sagledavanjem faktora koji pozitivno utiču na regulacijske mehanizme biosinteze enzima. Proizvodnja enzima velike aktivnosti, stabilnosti i jedinstvenih svojstava može proširiti oblast njihove primene i na nove tehnologije za preradu agro-industrijskog otpada. U radu će se ispitati fermentacije i sa mikroorganizmima koji imaju GRAS status zbog kasnije potencijalne primene profermentisanog supstrata sa biomasom za stočnu hranu sa poboljšanom digestivnosti i biološkom vrednosti.

Odabrane su sledeće hipoteze sa kojima se započinje istraživanje u ovoj disertaciji i to:

- Testiranje velikog broja biomogućice pronalaženje produktivnog proizvodnog soja koji može uspešno da sintetiše celulaze, mananaze, proteaze ili amilaze u velikom prinosu bez stvaranja sporednih proizvoda i drugih enzima kako bi se kasnije primenile jednostavne tehnike za izdvajanje i prečišćavanje enzima;
- Odabrani proizvodni mikroorganizmi, ili neki od njih, moći će uspešno da rastu i sintetišu enzime na čvrstim agro-industrijskim otpadnim materijalima poput sojine sačme i ljuspica, kukuruzne sačme, pogače nakon ekstrakcije ulja, pšenične pleva;

- Postupak proizvodnje navedenih enzima pomoću odabranog proizvodnog mikroorganizma može se višestruko pospešiti pažljivim izborom komponenata hranljive podloge i parametara procesa;
- Celulaze, mananaze i amilaze su uglavnom inducibilni ekstracelularni enzimi podložni i drugim regulatornim mehanizmima, pa se njihova biosinteza može višestruko povećati dodatkom odgovarajućih supstrata ili analoga supstrata ili sprečavanjem kataboličke represije;
- Pretretman supstrata alkalnim, kiselim ili drugim fizičko-hemijskim postupkom (ultrazvučni tretman, tretman mikrotalasima) omogućuje povećan priraštaj biomase i prinos ciljnih enzima;
- Primenom čvrstog otpada nastalog pri preradi soje, kukuruza i suncokretakao supstrata u proizvodnji enzima povećaće se dodana vrijednost tog nusproizvoda, odnosno, nakon fermentacije ovi supstrati će imati bolji nutritivni sastav (veći sadržaj proteina, manji sadržaj antinutritivnih faktora poput tripsin inhibitora i fitinske kiseline) sa aspekta primene kao stočne hrane;
- Proizvodnjom celulaza, mananaza, proteaza i amilaza fermentacijom na čvrstom agro-industrijskom otpadu sa odabranim mikroorganizmom pod optimalnim uslovima moguće je ostvariti veći prinos aktivne forme enzima i povećanje ekonomičnosti procesa u odnosu na klasični submerzni postupak dobijanja enzima;
- fermentacijom na čvrstom agro-industrijskom otpadu sa odabranim mikroorganizmima, koji imaju GRAS status pod optimalnim uslovima, poboljšavaju se nutritivna svojstva otpadnog materijala i redukuju problemi vezani za odlaganje ovakve vrste otpada i zagađivanje životne sredine;
- Proizvedene celulaze, mananaze, amilaze i proteaze imaju odgovarajuća svojstva (aktivnost i termičku stabilnost, pH i temperaturni profil, poziciju i regiospecifičnost) za primenu u razgradnji ligno-celulozne biomase.

4. Naučne metode istraživanja

Za karakterizaciju supstrata na bazi agroindustrijske biomase koristeće se standardne hemijske metode. Sadržaj azota će se određivati metodi po Kjeldal-u, sadržaj masti metodom po Soxlet-u; sadržaj vlage metodom sušenja do konstantne mase i po metodi Karl-Fišera (Karl-Fischer), sadržaj pepala spaljivanjem. Proizvodnja hidrolitičkih enzima pomoću odabranih mikroorganizama biće vršena tehnikom gajenja na čvrstim podlogama, odnosno bez prisustva slobodne vode.

Za pripremu proizvodnih mikroorganizama za fermentaciju koristeće se standardne mikrobiološke tehnike pripreme, čuvanja, gajenja, presejavanja, aktiviranja, selekcije, brojanja mikroorganizama, kao i tehnike sterilnog laboratorijskog rada. Utvrđivanje sposobnosti mikroorganizama za proizvodnju određenih enzima izvršiće se u skladu sa dobro poznatim konceptom gajenja na selektivnim podlogama sa i bez dodatka fluorescentne boje Rhodamine B. Na primer, u slučaju proizvodnje mananaza, korišćeni medijum za selekciju kao jedini izvor ugljenika nudi manan izolovan iz semena rogači, za proizvodnju pektinaza pektin, celulaza karboksimetil-celulozu, što znači da bakterije sposobne da prežive i rastu na ovoj podlozi moraju imati enzim (ili skup enzima čija je ekspresija regulisana pod istim operonom), koji im omogućava razgradnju i iskorišćenje produkata te razgradnje. Mikroorganizmi producenti

enzima će biti selektovani na osnovu veličine prozirne zone oko izraslih kolonija nakon 72 h, odnosno na osnovu veličine fluorescirajuće zone nakon osvetljavanja UV svetlošću u podlozi sa dodatkom Rhodamine B. Nakon završenih eksperimenata, odabrani proizvodni soj, ukoliko se radi o novom izolatu, će biti identifikovan na osnovu gena za 16s ribozomalnu RNK (16s rRNK). Ukratko, genomske DNK će biti izolovane fenol-hloroformsom metodom, dok će se amplikoni sekvence gena od interesa dobiti primenom lančane reakcije polimeraze (PCR). Sekvenciranje će se izvršiti Sangerovom metodom, a sekvence će biti poravnate radi poređenja u odnosu na javno dostupnu referentnu bazu podataka.

Ispitaće se uticaj različitih pretretmana supstrata poput tretiranja hlorovodoničnom kiselinom, natrijum-hidroksidom, ultrazvukom srednjeg intenziteta generisanog sandom frekvence 20 kHz i mikrotalasima pri različitim dužinama tretmana i amplitudama (snazi) pri kontrolisanom temperaturnom režimu na prinos biomase i enzima. Enzimska aktivnost će se u svim slučajevima određivati prema originalnim ili modifikovanim procedurama iz literature. Tako, aktivnosti amilaze, mananaze i celulaze odrediće se na osnovu sadržaja redukujućih šećera pomoću dinitrosalicilne metode primenom različitih model supstrata (skroba, manana, pektina i karboksimetil-celuloze), dok će proteolitička aktivnost biti određena spektrofotometrijski praćenjem brzine hidrolize azo-kazeina. Sadržaj proteina u nekim slučajevima biće određen i standardnim spektrofotometrijskim metodama po Loriju (Lowry) i Bradfordu. Mogućnost primene profermentisanih medijuma kao stočne hrane određivaće se na osnovu praćenja sadržaja fitinske kiseline, polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.

Nakon fermentacije enzima pristupiće se optimizaciji postupka ekstrakcije. Izabraće se centralni kompozitni rotatabilni dizajn sa naznačenim brojem faktora (u zavisnosti od broja promenljivih) i na potrebnom broju nivoa (u zavisnosti od intervala promenljive). Na ovaj način će se kvantitativno utvrditi uticaj svakog faktora na proizvodnju celulaze, proteaze i amilaze, kao i njihova međusobna korelacija. Ispitaće se mogućnost matematičkog opisivanja dobijenih rezultata regresionim modelom drugog reda koji uključuje interakciju između, npr. četiri faktora:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i,j,i < j} b_{ij} x_i x_j$$

gde je y očekivani odziv (hidrolitička aktivnost), b_0 odsečak, b_i linearni koeficijent, b_{ij} koeficijent interakcije između promenljivih. Regresionom i disperzionom analizom ispitaće se adekvatnost regresionih modela korišćenjem odgovarajućih kompjuterskih programskih paketa (Matlab). Adekvatnost modela biće ocenjena na osnovu Fišerovog koeficijenta. Signifikantnost koeficijenata regresije ispitaće se primenom Studentovog testa.

Dobijeni enzimi će se dalje prečišćavati frakcionim taloženjem amonijum-sulfatom, organskim rastvaračima, kao i metodama jonoizmenjivačke i gel-filtracione hromatografije. Čistoća i molekulska masa proizvedenih enzima određivaće se metodom native i SDS-PAGE elektroforeze uz korišćenje komercijalnih standarda i izvršiće se njihova primarna karakterizacija u pogledu temperaturnih i pH profila.

Antioksidativna aktivnost hidrolizata i/ili frakcija peptida ispitaće se spektrofotometrijskim merenjem sposobnosti hidrolizata i/ili frakcija peptida da: redukuju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH•) i 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikalski katjon (ABTS•+). Određivanje sadržaja antinutritivnih komponenti nakon fermentacije će se meriti određivanjem sadržaja tripsin inhibitora, i određivanjem sadržaja fitinske kiseline. Ukupni fenoli će biti određeni metodom po Folin-Ciocalteu.

5. Očekivani naučni doprinos

Iako su danas postignuti određeni pomaci u oblasti proizvodnje celulaza, mananaza, amilaza i proteaza kao i u postupku konverzije lignocelulozne biomase do hemikalija, stočne hrane i drugih proizvoda, i dalje su osnovne prepreke i uska grla ovih procesa, koji sprečavaju njihovu širu industrijsku primenu, visoka cena i nedostatak poznavanja tačnih mehanizama biosinteze enzima. Ni do danas nisu potpuno okarakterisane specifičnosti indukcije celulaza, hemicelulaza i drugih enzima koji razgrađuju ćelijski zid biljaka, pogotovo kada se koriste kompleksni supstrati. Takođe, postojeće informacije ne definišu koji su idelani bioreaktori za fermentaciju čvrstih supstrata. Da bi se optimizovali procesi fermentacije na čvrstim supstratima potrebno je razviti precizne modele koji opisuju biološke fenomene i fenomene prenosa toplote i mase. Novi koncepti i rešenja koji će proizaći iz ove doktorske disertacije za konstrukciju produktivnih sistema za konverziju agro-industrijskih otpadnih supstrata mogli bi poslužiti kao osnova za slične koncepte za proizvodnju bioloških proizvoda na drugim otpadnim materijalima.

. Kao rezultat predloženih istraživanja očekuju se sledeći pojedinačni naučni doprinosi:

- razvoj nekoliko visokoproduktivnih mikroorganizama za produkciju celulaza, mananaza, proteaza ili amilaza fermentacijom na čvrstim otpadnim tokovima agro-industrije;
- pouzdana identifikacija nekoliko prirodnih izolata različitih vrsta iz roda *Bacillus* na osnovu standardnih biohemijskih i morfoloških karakteristika, kao i na osnovu savremenih gentičkih tehnika;
- odabir odgovarajuće sirovine ili odgovarajuće kombinacije dve i više sirovina za ekonomičnu i efikasnu biosintezu ciljnih enzima, celulaza, mananaza, proteaza i amilaza;
- rasvetljavanje regulatornih mehanizama, indukcije i represije, u biosintezi enzima koji razgrađuju membrane biljnih ćelija;
- identifikacija induktora i regulatornih mehanizama ekspresije gena za biosintezu enzima od značaja u novoizolovanoj vrsti iz roda *Bacillus* sp. TMF-1;
- optimizacija procesnih parametara i sastava hranljive podloge pri mikrobiološkoj proizvodnji navedenih enzima na poljoprivrednim i industrijskim otpadima (sojina sačma, kukuruzna sačma, pogača masline, pšenična pleva);
- utvrđivanje uticaja mikrotalasnog i ultrazvučnog pretretmana na supstrate;
- utvrđivanje uticaja hemijskog pretretmana na supstrate;
- utvrđivanje kinetike biosinteze enzima i ćelijskog rasta pri optimalnim uslovima;
- valorizacija poljoprivrednog otpada kao supstrata za kultivaciju odabranih sojeva mikroorganizama u cilju proizvodnje industrijski važnih enzima;
- naučni i praktični doprinos rešavanju zagađivanja životne sredine poljoprivrednim i industrijskim otpadom;
- utvrđivanje optimalnog načina prečišćavanja dobijenih enzima sa aspekta ostvarivanja najvećih prinosa ili, u slučaju ko-produkcije enzima, zadovoljavajućeg sastava dobijene smeše za ciljanu primenu;
- sagledavanje i analiza ukupne tehno-ekonomske opravdanosti postupka proizvodnje enzima sa aspekta plasiranja ostataka fermentacije kao supstrata sa poboljšanim nutritivnim svojstvima za primenu kao stočne hrane.

6. Plan istraživanja i struktura rada

Predložena disertacija biće sačinjena iz nekoliko celina: prva celina obuhvatiće selekciju mikroorganizma. Izvršiće se testiranje većeg broja prirodnih izolata i komercijalnih vrsta iz roda *Bacillus* sa ciljem pronalaženja mikroorganizma koji produkuje enzime željenih svojstava. Kriterijumi za izbor odgovarajuće vrste biće vrednost enzimskih aktivnosti, svojstva enzima, naročito njihova specifičnost prema određenim suspratima. Ispitaće se i karakteristike poljoprivrednog otpada koji će se koristiti kao podloga za gajenje mikroorganizama. Takođe će se ispitati i karakteristike dobijenih enzima kao što su specifičnost, temperaturni optimum, stabilnost, pH optimum.

U drugom delu ispitaće se mogućnost unapređenja gajenja mikroorganizama tretiranjem podloga pre zasejavanja i fermentacije. Cilj je poboljšanje biodigestibilnosti supstrata i asimilacija hranjivih nutritijenata. Definisaće se odgovarajući pretretman podloge koji će uključivati različite hemijske (tretman kiselinama i alkalijama) ili fizičke metode (ultrazvuk visokog intenziteta, tretman mikrotalasima), u slučaju primene kompleksnih lignoceluloznih ili skrobnih supstrata. Na primer, ultrazvučna ekstrakcija podrazumeva korišćenje ultrazvuka sa frekvencijama u rasponu od 20-100kHz i velikog intenziteta ($10-1000\text{W}/\text{cm}^2$). Učinkovitost pretretmana supstrata ultrazvukom određuje se sa četiri parametra: specifičnom energijom, ultrazvučnom frekvencijom, trajanjem tretmana i karakteristikama same podloge. Tokom ultrazvučnog tretmana dolazi do rasta lokalne temperature, visokog pritiska i pojave smicajnih sila usled fenomena kavitacije, što može imati značajan uticaj na biomakromolekule, razlaganje kompleksa između biopolimera i ostalih molekula čime se povećava biodostupnost mikroorganizmu. Za razliku od ultrazvučnog tretmana koji ima malo neželjenih efekata, hemijski tretman dovodi potencijalno do obrazovanja toksičnih proizvoda i inhibicije rasta mikroorganizma. Zbog toga se pretretman mora kontrolisano sprovesti kako bi se izbegle hemijske promene i termalna degradacija supstrata i postigao povoljan učinak tretmana.

Da bi se maksimalno iskoristile prednosti koje proističu iz specifičnosti gajenja mikroorganizama na čvrstim podlogama, kao što su visoki prinosi i dobijanje visoko koncentrovanog proizvoda, neophodno je, takođe, optimizovati ekstrakciju i prečišćavanje proizvoda iz fermentacione pogače. Treća celina biće posvećena metodama ekstrakcije enzima iz fermentacione podloge. Optimizovaće se klasični postupak ekstrakcije u pogledu određivanja pH, brzine mešanja, odnos tečnost/čvrsto i vreme ekstrakcije. Klasični postupak ekstrakcije će se porediti sa ultrazvučnom ekstrakcijom. Proces prečišćavanja znatno doprinosi ukupnim troškovima proizvedenog enzima, i stoga se moraju primeniti posebne strategije da se optimizuje svaki proces fermentacije sa stanovišta čistoće, prinosa i efikasnosti. Ukoliko se sirovi fermentisani proizvod koristi kao izvor enzima, dodatno prečišćavanje nije potrebno. U suprotnom, ekstrakcija predstavlja prvi korak u procesu separacije i prečišćavanja nakon gajenja mikroorganizama na čvrstoj podlozi. Stoga je od presudne važnosti da se dizajnira efikasna metoda za ekstrakciju fermentisanih supstrata na način koji omogućava minimalne troškove proizvodnje i optimalan kvalitet proizvoda.

Poslednja, četvrta celina će obuhvatiti analizu u promeni hemijskog sastava supstrata nakon završene fermentacije. Preciznije, vršiće se analiza fermentisane podloge radi evaluacije uticaja proizvodnih mikroorganizama na nutritivni kvalitet profermentisanog supstrata.

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:

- Čvrsti otpadi koji nastaju tokom prerade soje, kukuruza i suncokreta sa potencijalnom primenom kao supstrata za proizvodnju hidrolitičkih enzima
- Mogućnost valorizacije čvrstog otpada i nus-proizvoda
- Pregled proizvodnje enzima fermentacijom na čvrstoj podlozi od poljoprivrednog i industrijskog otpada
- Mikrobiološka proizvodnja enzima
- Amilaze i njihova svojstva
- Proteaze i njihova svojstva
- Celulaze i njihova svojstva
- Mananaze i njihova svojstva
- Pretretmani čvrstih podloga
- Optimizacija metoda ekstrakcije fermentisanih supstrata
- Određivanje nutritivnih karakteristika i biološke vrednosti profermentisanih supstrata

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

- Materijali i hemikalije korišćene u radu
- Opis eksperimentalnih tehnika za karakterizaciju fermentacionih pogača
- Opis eksperimentalnih tehnika za ispitivanje enzimске aktivnosti mikroorganizama
- Opis tehnika za tretiranje podloga pre fermentacije
- Eksperimentalni plan optimizacije postupka ekstrakcije enzima iz fermentacione pogače
- Opis eksperimentalnih tehnika za određivanje nutritivnih karakteristika fermentacione pogače

Poglavlje *Rezultati i diskusija* sadržaće detaljan prikaz svih dobijenih rezultata kao i njihovu diskusiju. Kvantitativno će se razmatrati uticaj procesnih parametara na količinu proizvedenih enzima i međusobne interakcije. Poređiće se različiti supstrati korišćeni za fermentaciju i proizvodnju enzima. Ispitaće se uticaj pretretmana podloga na sintezu enzima. Posebno će se analizirati rezultati optimizacije klasične ekstrakcije enzima kao i ultrazvučne ekstrakcije. Postupak fermentacije će biti optimizovan sagledavanjem faktora koji pozitivno utiču na regulacijske mehanizme biosinteze enzima. Posebno će biti diskutovane mogućnosti povećanja dodatne vrednosti poljoprivrednog otpada fermentacijom sa aspekta primene u ishrani stoke, odnosno razvoja procesa u kojem će se, primenom mikroorganizama, dobiti visoka vrednost produkovanih enzima uz dobijanje nutritivno vredne biomase.

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 kandidata Abdalle Ali Salim pod nazivom „**Proizvodnja hidrolitičkih enzima fermentacijom na poljoprivrednom otpadu pomoću različitih vrsta iz roda *Bacillus***“ (**Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.**) naučno zasnovana i predlaže Nastavno-naučnom veću da je prihvati. Komisija, takođe smatra, da je kandidat podoban za realizaciju ove teze. Za mentora se predlaže dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pripadaju naučnoj oblasti Tehnološko inženjerstvo, uža naučna oblast Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, za koju je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu matična ustanova.

U Beogradu 08.04.2019.

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Ljiljana Mojović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Mirjana Antov, redovni profesor
Univerziteta u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

Dr Nevena Luković, naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Nataša Šekuljica, naučni saradnik
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta