

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/368

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

11.01.2022.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације
и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова
примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Невена (Владета) Илић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Мастер студије, Мастер инжењер технологије

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2018.
-

4. Година уписа на докторске студије: 2018.
-

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ :

Име и презиме ментора: др Сузана Димитријевић-Бранковић

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Milić, M. D., Buntić, A.V., Mihajlovski, K.R., Ilić N. V., Davidović S. Z., Dimitrijević-Branković S. I., (2021). The development of a combined enzymatic and microbial fermentation as a viable technology for the spent coffee ground full utilization, Biomass Conversion and Biorefinery. doi:10.1007/s13399-021-01605-8, (M21, IF (2020) 4.987 Engineering, Chemical; ISSN: 2190-6815)
2. Mihajlovski, K., Buntić, A., Milić, M., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2020). From Agricultural waste to biofuel: enzymatic potential of a bacterial isolate Streptomyces fulvissimus CKS7 for bioethanol production. Waste and Biomass Valorization, 1-10. (M22, IF 2.608, Environmental Sciences, 118/265, SSN 1877-2641)
3. Mihajlovski, K., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2020). Enzymatic hydrolysis of waste bread by newly isolated Hymenobacter sp. CKS3: Statistical optimization and bioethanol production. Renewable Energy, 152, 627-633. (M21, IF = 6.274 Energy & Fuels, 19/112, ISSN 0960-1481).
4. Nešić, A., Cabrera-Barjas, G., Dimitrijević-Branković, S., Davidović, S., Radovanović, N., & Delattre, C. (2020). Prospect of polysaccharide-based materials as advanced food packaging. Molecules, 25(1), 135. (M22, IF 3.267, Chemistry, Multidisciplinary, 70/177, ISSN 1420-3049)
5. Mihajlovski, K., Radovanović, Ž., Carević, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2018). Valorization of damaged rice grains: Optimization of bioethanol production by waste brewer's yeast using an amylolytic potential from the Paenibacillus chitinolyticus CKS1. Fuel, 224, 591-599. (M21a, IF 5.128, Engineering, Chemical, 13/138, ISSN 0016-2361)

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф.дрПетарУскоковћ

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

ДП

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.43. Правилника о докторским студијама ТМФ-а на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 23.12.2021. 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 **Невене Илић**, број индекса 4001/2018, под називом: **„Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре“**.

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

За ментора се одређује др Сузана Димитријевић-Бранковић, 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

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Технолошко-металуршки факултет

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата **Мр Невене Илић, мастер инжењера технологије** за израду докторске дисертације

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета бр. 35/291 од 18.11.2021. године, именовали смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата **Мр Невене (Владета) Илић, мастер инжењера технологије** за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом:

„Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре“

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Рођена је 22.12.1994. године у Ужицу, Србија. Завршила је основну школу „Саво Јовановић Сирогојно” у Сирогојну 2009. године, након чега је уписала Ужичку гимназију. Основне академске студије је уписала на Биолошком факултету, Универзитета у Београду 2013. године, а завршила их 2017. године са просечномоценом 9,60 и тиме стекла звање дипломирани биолог. Исте године уписала је мастер академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду изавршила 2018. године са темом „Биомониторинг и фиторемедијација земљишта загађеног тешким металима у општини Бор”. Просечна оцена током мастер студија је била 9,29. Школске 2018/2019 године уписала је докторске академске студије на истом факултету, на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију, под руководством ментора проф. др Сузане Димитријевић-Бранковић. На докторским студијама је положила све испите предвиђене наставним програмом, са просечном оценом 9,64. До сада је објавила два рада у врхунском међународном часопису, саопштила два рада на међународној конференцији, штампана у целости и један рад на међународној конференцији, штампан у изводу.

Током основних академских студија, била је учесник неколико конференција из области екологије и заштите животне средине. Волонтирала је као водич у Ботаничкој

башти „Јевремовац”. Била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, све до ступања у радни однос, од када је запослена као истраживач приправник на Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, у оквиру националног пројекта

„Примена биотехнолошких метода у одрживом искоришћењу нус-производа агроиндустрије”, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Од 2020. године члан је пројекта Proof of Concept-PoC 5634, под називом „Еколошки биокатализатор за обезбојавање и разградњу азо боја из индустријских отпадних вода применом лаказе из гљиве белог труљења имобилисане на рециклираном агроиндустријском отпаду”, под руководством др Катарине Михајловски.

1.2. Сечено научно-истраживачко искуство

Невена В. Илић, мастер инжењер технологије, у току досадашњег рада показала је савесност и склоност ка научноистраживачком раду који је усмерила ка истраживањима везаним за производњу лаказа гљивама белог труљења на агроиндустријском отпаду и примену лаказа у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре. У оквиру докторских студија положила све испите предвиђене студијским програмом са просечном оценом 9,64.

Списак предмета положених на докторским студијама

Предмет	Оцена	ЕСПБ
1. Структурна анализа органских молекула	10 (десет)	6
2. Индустријска микробиологија	10 (десет)	5
3. Хемија пестицида	10 (десет)	5
4. Санитарна микробиологија	10 (десет)	4
5. Одабрани микробиолошки процеси у заштити животне средине	10 (десет)	4
6. Одабрана поглавља инструменталне анализе	10 (десет)	7
7. Одабрана поглавља биохемије-витамини	10 (десет)	5
8. Биохемијска кинетика	10 (десет)	5
9. Хемијска кинетика	6 (шест)	5
10. Одабрана поглавља математичке анализе	10 (десет)	5
11. Завршни испит	10 (десет)	30
	Просечна оцена 9,64	Укупно ЕСПБ 81

Списак објављених научних радова и саопштења

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. Milić, M. D., Buntić, A. V., Mihajlovski, K. R., **Ilić N. V.**, Davidović S. Z., Dimitrijević-Branković S. I., (2021). The development of a combined enzymatic and microbial fermentation as a viable technology for the spent coffee ground full utilization, Biomass Conversion and Biorefinery. doi:10.1007/s13399-021-01605-8, (IF (2020) =4,987; ISSN: 2190-6815)

2. **Илић, Н.**, Davidović, S., Milić, M., Rajilić-Stojanović M., Pecarski D., Ivančić-Šantek M., Mihajlovski K., Dimitrijević-Branković S., (2021). Valorization of lignocellulosic wastes for extracellular enzyme production by novel Basidiomycetes: screening, hydrolysis and bioethanol production, Biomass Conversion and Biorefinery. DOI : 10.1007/s13399-021-02145-x, (IF (2020) =4,987, ISSN 2190-6815)

Саопштење са међународног скупа штампано у целости (M33)

3. **Илић Н. В.**, Lazić V., Radovanović N. R., Mihajlovski K. R., Davidović S. Z., Miljković M. G., Investigation of the influence of different nanoparticles on the growth of soil microorganisms and organic mung bean. VII International Congress “ Engineering, Environment and Materials in Process Industry“, March 17-19, 2021, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, p. 451-460, Proceedings (ISBN: 978-99955-81-40-4)

4. **Илић Н. В.**, Kukučka A. M., Milić M. D., Milutinović M. D., Miljković M. G., Davidović S. Z., Synthesis and characterization of agar-agar-chitosan composite films incorporated with green synthesized silver nanoparticles. VII International Congress “ Engineering, Environment and Materials in Process Industry“, March 17-19, 2021, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, p. 461-469, Proceedings (ISBN: 978-99955-81-40-4)

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

5. **Илић Н. В.**, Milić M. D., Davidović S. Z., Mihajlovski K. R., Dimitrijević-Branković S. I., The evaluation of the antioxidant potential during the oxidative polymerization of polyphenol compounds induced by laccase enzyme. The 2nd Unifood International Conference-UNIFood Conference 2021, September 24-25, 2021, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, p.158, Book of Abstracts (ISBN:978-86-7522-066-4)

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег истраживачког рада и стеченог искуства, Невена В. Илић, мастер инжењер технологије, показала је склоност и способност за бављење научно-истраживачким радом, као и изузетно интересовање и висок степен самосталности у реализацији истраживања везаних за докторску дисертацију. До сада је објавила два рада у врхунском међународном часопису категорије M21, при чему је на једном први аутор, а на другом коаутор. Објавила је и три саопштења на међународним конференцијама, два штампана у целости и једно штампано у изводу. Комисија сматра да кандидат Невена В. Илић, мастер инжењер технологије, испуњава све услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Лаказе (Е.Ц. 1.10.3.2., п-бензендиол: кисеоник оксидоредуктазе) спадају у групу купропротеина. Имају способност да оксидују широк спектар ароматичних и неароматичних једињења, укључујући пре свега феноле, ароматичне аминне, бензентиоле, као и неорганске јоне, редукујући истовремено кисеоник до воде (1–4). Лаказе су први пут изоловане из сока јапанског дрвета лака, *Rhus verniciflua*. Широко су распрострањене и могу се изоловати из бактерија, гљива, биљака и неких инсеката.

Лаказе биљака имају значајну улогу у механизму формирања лигнина, док лаказегљива, које представљају њихове екстрацелуларне секундарне метаболите, учествују у морфогенези, интеракцијама биљка-патогена гљива, разградњи лигнина и одбрани од стреса (3,5,6). Код гљива је уочена варијабилност у механизму индукције експресије лаказа, степену полиморфизма и физичко-хемијским (молекулска маса, изоелектрична тачка и садржај угљерних хидрата) и кинетичким особинама (7). На производњу ових ензима од стране гљива утиче неколико фактора: температура, рН, извор угљеника, извор азота, различити стимулатори, инхибитори и начин култивације. Код неких гљива додаток индучера током гајења доводи до биосинтезе нових екстраћелијских изоформи лаказа (8–12). Продукција лаказа је карактеристична за Basidiomycetes, међу којима су посебно значајне гљиве беле трулежи. Међу најзначајнијим продуцентима се издвајају врсте родова *Trametes*, *Phlebia*, *Pleurotus* и *Psynoporus*. Лаказе су описане као једини лигнинолитички ензим код врсте *Psynoporus cinnabarinus* (13,14).

Лаказе одликује ниска специфичност према супстрату, али висока каталитичка активност, што додатно доприноси њиховој све већој примени у различитим индустријским и биотехнолошким областима, укључујући биодеградацију синтетичких боја, конверзију ароматичних једињења и уклањање фенола који су главни узрочници тератогенеза и канцера. Способност оксидације фенолних једињења их чини погодним за обезбојавање вода текстилне индустрије и разградњу ксенобиотика у отпадним водама(7,15,16).

Проблем индустријског бојења текстила поред велике потрошње енергије иводе, обухвата и ослобађање 5-40 % коришћених боја у отпадне воде. Многе од тих боја су канцерогене и имају негативан утицај на акватичне екосистеме. Уклањање боја се може вршити физичким, хемијским и биолошким поступцима. С обзиром на синтетичко порекло боја, њихову молекулску структуру, уклањање истих је велики изазов. Многе од метода су неефикасне, економски неисплативе, а хемијске методе доводе до додатног формирања штетних нус-продуката. Велики значај у оваквим околностима су добиле лаказе гљива белог труљења, захваљујући способности да разграђују текстилне боје (конго црвена, азур Б, блиставо зелена...) (9,17–20).

Фармацеутски производи представљају синтетичке или природне хемикалије које се користе као лекови и ветеринарски лекови. Годишња потрошња фармацеутских производа на глобалном нивоу се процењује на око 100 000 тона. Широка употреба фармацеутских производа доводи до њиховог сталног испуштања у животну средину у нетакнутој форми. До данас је испитан потенцијал многих конвенционалних метода у поступцима уклањања фармацеутског отпада, али су се показале као недовољно ефикасне и изузетно скупе. С обзиром да се фармацеутски отпад одликује ниском биорасполжљивошћу и сложеностом структуром, као алтернативни третман се све више користи третман лигноцелулозним ензимима који су способни да катализују специфичне реакције (21–24).

У овој докторској дисертацији ће се извршити молекуларна идентификација гљива белог труљења PCR методом. Након идентификације гљива, испитаће се

ензимски потенцијал идентификованих сојева API ZYM тестом и квалитативним тестом.

Како би се извршила производња лаказа, идентификовани сојеви за које се квантитативном и квалитативном методом утврди способност производње лаказа, ће се поступком ферментације на чврстом супстрату узгајати на неколико врста лигноцелулозног агроиндустријског отпада. На основу активности лаказа добијених овим поступком ће се одабрати најбољи продуцент лаказа, као и супстрат на коме се добија лаказа са највећом активношћу ради даље оптимизације процеса производње, екстракције и пречишћавања ензима. Након производње лаказе извршиће се карактеризација исте. Поступак карактеризације ће обухватати одређивање оптималне температуре и рН активности лаказа, испитивање кинетике ензима, као и одређивање потенцијалних инхибитора и стимулатора лаказне активности.

Добијена окарактерисана лаказа ће се користити у поступцима разградње боја које имају широку примену у текстилној индустрији, као и фармацеутских производа, антибиотика тетрациклина, који су једни од главних контаминената животне средине.

У случају текстилних боја, извршиће се оптимизација процеса разградње сваке боје, одређивањем оптималне температуре и рН. Након разградње појединачних боја, испитаће се потенцијал лаказа у поступку разградње тзв. синтетичке текстилне воде. Антимикробна активност и фитотоксичност производа разградње ће се испитати третманом на неколико врста микроорганизама и биљке пшенице. Новонастале промене у структури боја током поступка разградње ће такође бити окарактерисане инструменталном методом.

Разградња фармацеутских производа, антибиотика, ће такође бити извршена помоћу ензима лаказа на адекватној температури и рН, у складу са својствима самих фармацеутских производа. Након поступка разградње извршиће се испитивање антимикробне активности производа разградње антибиотика тетрациклина, као и инструментална анализа истих.

Како би се што поузданије и прецизније окарактерисао потенцијал и компетитивност лаказе новоидентификованог природног изолата у поступцима разградње, додатно ће се боје и фармацеутски производи третирати комерцијалном лаказом.

Производња лаказа на агроиндустријском отпаду употребом нових идентификованих сојева и примена истих у поступку разградње опасних загађујућих материја у животној средини представља велики изазов, с обзиром да друге методе могу бити мање ефикасне, скупе и најбитније, могу довести до настанка опасних нус-производа разградње.

Циљ ове докторске дисертације је да се помоћу агроиндустријског отпада синтетишу лигнинолитички ензими из групе лаказа помоћу гљива брелог труљења, који се касније могу користити у поступцима разградње загађујућих органских

једињења заступљених у животној средини уз малу могућност настанка токсичних нус-производа разградње. Посебан значај дисертације се огледа у томе што се за производњу лаказа користи агроиндустријски отпад, који се на овакав начин рециклираистовремено дајући производе који имају способност разградње загађујућих органских једињења.

Литература

1. Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, Gutiérrez-Soto G, Hernández-Luna CE, Herrera De Los Santos M, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact.* 2019;18 (1):1–33. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
2. Zhongyang D, Lin P, Youzhi C, Liang Z, ZhenghuaGu, Guiyang S, et al. Production and characterization of thermostable laccase from the mushroom, *Ganoderma lucidum*, using submerged fermentation. *African J Microbiol Res.* 2012 Feb 16; 6 (6):1147–57.
3. Jeon JR, Baldrian P, Murugesan K, Chang YS. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: From in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microb Biotechnol.* 2012; 5 (3):318–32.
4. Smirnov SA, Koroleva O V., Gavrilova VP, Belova AB, Klyachko NL. Laccases from basidiomycetes: Physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biokhimiya.* 2001; 66 (7):952–8.
5. Abd El Monssef RA, Hassan EA, Ramadan EM. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Ann Agric Sci.* 2016 Jun 1;61(1):145–54.
6. Selinheimo E, Valtion teknillinen tutkimuskeskus. Tyrosinase and laccase as novel crosslinking tools for food biopolymers. VTT; 2008.
7. Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. Vol. 5, *Bioresources and Bioprocessing.* Springer; 2018.
8. Abo-State MAM, Khatab O, Abo-El Nasar A, Mahmoud B. Factors affecting laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *World Appl Sci J.* 2011;14(11):1607–19.
9. Patel N, Shahane S, Shivam, Majumdar R, Mishra U. Mode of Action, Properties, Production, and Application of Laccase: A Review. *Recent Pat Biotechnol.* 2018 Dec 21;13(1):19–32.
10. Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Vol. 2011, *Enzyme Research.* 2011.
11. Singhanian RR, Patel AK, Thomas L, Goswami M, Giri S, Pandey A. Industrial Enzymes. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology.* Elsevier B.V.; 2015. 473–497 p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00015-X>
12. Zerva A, Simić S, Topakas E, Nikodinovic-Runic J. Applications of microbial laccases: Patent review of the past decade (2009–2019). Vol. 9, *Catalysts.* MDPI AG; 2019.
13. Volk TJ. Fungi. In: *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition.* Elsevier Inc.; 2013. p. 624–40.

14. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. Vol. 30, FEMS Microbiology Reviews. 2006. p. 215–42.
15. Majeau JA, Brar SK, Tyagi RD. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. Bioresour Technol. 2010;101(7):2331–50.
16. Mate DM, Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. Vol. 10, Microbial Biotechnology. John Wiley and Sons Ltd; 2017. p. 1457–67.
17. Lončar NL. UNIVERZITET U BEOGRADU HEMIJSKI FAKULTET UKLANJANJE FENOLA I BOJA IZ OTPADNE VODE PRIRODNIM I REKOMBINANTNIM OKSIDATIVNIM ENZIMIMA doktorska disertacija. 2012.
18. Moreno AD, Ibarra D, Eugenio ME, Tomás-Pejó E. Laccases as versatile enzymes: from industrial uses to novel applications. Vol. 95, Journal of Chemical Technology and Biotechnology. John Wiley and Sons Ltd; 2020. p. 481–94.
19. Zucca P, Cocco G, Sollai F, Sanjust E. Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. Biocatalysis. 2016;1(1):82–108.
20. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl Environ Microbiol. 2000;66(8):3357–62.
21. Parra Guardado AL, Belleville MP, Rostro Alanis M de J, Parra Saldivar R, Sanchez-Marcano J. Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. ProcessBiochem. 2019;78(December 2018):123–31. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.032>
22. Asif MB, Hai FI, Singh L, Price WE, Nghiem LD. Degradation of Pharmaceuticals and Personal Care Products by White-Rot Fungi—a Critical Review. Curr Pollut Reports. 2017;3(2):88–103.
23. TRAN NH, URASE T, KUSAKABE O. Biodegradation Characteristics of Pharmaceutical Substances by Whole Fungal Culture *Trametes versicolor* and its Laccase. J Water Environ Technol. 2010;8(2):125–40.
24. Singh SK, Khajuria R, Kaur L. Biodegradation of ciprofloxacin by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. 3 Biotech. 2017;7(1).

3. Полазне хипотезе

Полазне хипотезе које се могу издвојити као основа за започињање научно-истраживачког рада у оквиру ове докторске дисертације су следеће:

Прва полазна хипотеза је да се агроиндустријски отпад који се ослобађа у великим количинама у живтну средину, може искористити за поризводњу лигнинолитичких ензима из групе лаказа, који имају способност разградње загађујућих органских једињења фенолне структуре. Сходно томе, у овој дисертацији испитаће се потенцијал агроиндустријског отпада за производњу лаказа.

Друга полазна хипотеза је да се за поступак добијања лаказа са високом каталитичком акивношћу морају оптимизовати услови производње поступком ферментације на чврстом супстрату. Сходно томе, оптимизација процеса ферментације ће обухватати оптимизацију услова као што су температура, влага, дужина трајања

процеса, концентрација инокулума, како би се добила лаказа високе каталитичке активности. Висока каталитичка активност под оптималним условима (оптимална температура и рН лаказне активности) се може уочити у поступку оксидације супстрата фенолне структуре, као што је гвајакол.

Трећа полазна хипотеза је да се применом ферментације на чврстом супстрату може добити лаказа високе каталитичке активности, а за ту сврху користиће се новоидентификовани сојеви гљива белог труљења са катедре за Биохемијско инжењерство и биотехнологију, Технолошко-металуршког факултета у Београду. Потребно је методом ланчане реакције полимеразе (PCR) идентификовати сојеве гљива белог труљења за које се квантитативним и квалитативним тестовима утврди да имају способност продукције лаказа.

Четврта полазна хипотеза је да се добијена лаказа може применити у поступку разградње загађујућих/токсичних текстилних боја и фармацеутског отпада, антибиотика тетрациклина, истовремено дајући мање токсичне и нетоксичне продукте разградње који не представљају претњу по здравље људи и животну средину.

4. Научне методе истраживања

У првом делу рада извршиће се молекуларна идентификација нових сојева гљива белог труљења методом ланчане реакције полимеразе (PCR). Испитаће се ензимски потенцијал идентификованих сојева квалитативним и квантитативним тестом. Ради производње лаказе, гљиве ће се узгајати на агроиндустријском отпаду поступком ферментације на чврстом супстрату, при чему ће се пратити утицај основних процесних променљивих, као што су време инкубације, концентрација инокулума и влага. Након поступка производње ензима, извршиће се екстракција и пречишћавање сировог ензимског екстракта, а затим и одређивање лаказне активности у датом екстракту уз поступак оптимизације одређивања лаказне активности који ће обухватати одређивање оптималне температуре и рН, потенцијалних инхибитора и стимулатора лаказне активности и кинетике. Лаказна активност сировог ензимског екстракта одређиваће се поступком оксидације супстрата фенолне природе, гвајакола, уз оптимизацију процесних променљивих, температуре и рН. Карактеризација лаказеће се извршити и полиакриламидном електрофорезом.

У другом делу рада испитаће се потенцијал произведене лаказе у поступцима разградње токсичних боја из текстилне индустрије и фармацеутског отпада (антибиотика тетрациклина). Установиће се оптимални услови разградње текстилних боја (концентрација боје, концентрација ензима, време трајања разградње, оптимална температура и рН разградње боја). Додатно ће се испитати и оптимизовати поступак разградње синтетичке текстилне воде. Оптимизација разградње фармацеутског отпада, антибиотика тетрациклина, обухватаће одређивање оптималне концентрације антибиотика, ензима и времена разградње под адекватном температуром која не изазива промена у хемијској структури самих тетрациклина. У поступцима разградње испитаће се потенцијал слободне лаказе, али и потенцијал имобилисаних лаказних

система уз оптимизацију истих. Ради утврђивања конкуритивности произведене лаказе, експерименти разградње ће бити одрађени и комерцијалном лаказом под оптималним условима.

У трећем делу рада извршиће се карактеризација производа разградње боја и антибиотика. Карактеризација ће обухватати детерминисање производа разградње HPLC методом и испитивање антимикробног дејства и фитотоксичности новонасталих производа. Антимикробна активност производа разградње текстилних боја ће бити испитана на врстама *Lactobacillus rhamnosus*, *Candida albicans*, отпадном пивском квасцу *Sacharomyces cerevisiae*, док ће антимикробна активност продукта разградње антибиотика бити испитана на патогеним врстама, *Echerichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Антимикробна активност ће се извршити методом одређивања броја преживелих ћелија. Фитотоксичност новонасталих производа разградње боја утврдиће се третманом семена биљке пшенице, *Triticum aestivum*, новонасталим производима разградње.

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације довести до:

- Утврђивања способности нових, идентификованих сојева виших гљива, са катедре за Биохемијско инжењерство и биотехнологију, Технолошко-металуршког факултета у Београду у поступку производње лаказа.
- Утврђивања утицаја оптимизације поступка производње, екстракције, пречишћавања на добијање лаказе високе активности.
- Утврђивања погодног агроиндустријског отпада за добијање ензима помоћу нових сојева гљива белог труљења.
- Утврђивања способности разградње загађујућих текстилних боја и фармацеутског отпада произведеном лаказом, што може имати значајан допринос заштити животне средине, као и глобалној економији, у смислу одрживог развоја.

6. План истраживања и структура рада

Предмет истраживања ове докторске дисертације је производња ензима лаказа на агроиндустријском отпаду поступком ферментације на чврстом супстрату коришћењем новоидентификованих сојева гљива белог труљења, ради добијања лаказе са израженом способношћу оксидације, односно разградње једињења фенолне структуре. Циљ је оптимизовати услове за добијање лаказе високе ензимске активности и испитати утицај процесних променљивих на постизање високе ензимске активности добијене лаказе. Добијени сирови ензимски препарати би своју примену могли имати у поступцима разградње и уклањања ксенобиотика фенолне структуре из отпадних вода.

У докторској дисертацији биће обрађена следећа поглавља: **Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература.**

У поглављу **Увод** биће приказана суштина истраживања, предмет и циљеви истраживања.

Теоријски део обухватиће детаљан преглед досадашњих истраживања у овој области кроз анализу доступне литературе из области:

- Basidiomycetes, гљиве белог труљења (морфолошке карактеристике гљива, продуценти лаказа међу гљивама белог труљења, лаказни гени и експресија лаказних гена код гљива);
- Молекуларна идентификација гљива (ланчана реакција полимеразе-PCR) и методе у квантификацији експресије лаказних гена;
- Лаказе (структура, природни извори, механизам реакције лаказе, подела лаказа);
- Производња лаказа (преглед фактора који утичу на производњу лаказа);
- Екстракција, пречишћавање лаказа и одређивање лаказне активности (поступци);
- Ксенобиотици фенолне структуре (боје текстилне индустрије, антибиотици тетрациклини), структура и карактеризација;
- Уклањање и разградња боја и фармацутског отпада (поступци, предности и мане поступака);
- Методе идентификације производа разградње, њиховог антимикуробног дејства и фитотоксичности;
- Имобилизација лаказа (методе имобилизације, типови носача за имобилизацију, карактеризација имобилизованих система и примери примене имобилизованих лаказа);

У поглављу **Експериментални део** биће наведени коришћени материјали и описане методе рада, и то:

- Поступак молекуларне идентификације гљива белог труљења (PCR метода);
- Поступци утврђивања способности производње ензима од стране идентификованих сојева, са посебним освртом на лаказе (квалитативни и квантитативни тестови, API ZYM тест);
- Поступак производње (ферментација на чврстом супстрату), екстракције, пречишћавања лаказе уз одређивање лаказне активности коришћењем гвајакола као супстрата;
- Поступак карактеризације добијене лаказе (одређивање оптималне температуре, pH, кинетике, стимулатора и инхибитора лаказне активности) и карактеризација лаказе полиакриламидном електрофорезом;
- Поступак разградње боја и отпадне текстилне синтетичке воде произведеном лаказом (оптимизација поступка);
- Поступак разградње фармацеутског отпада (антибиотика);
- Поступак идентификације производа разградње боја и антибиотика HPLCметодом;

- Поступак одређивања антимикуробне активности производа разградње боја и антибиотика методом одређивања броја преживелих ћелија;
- Поступак одређивања фитотоксичности производа разградње боја;
- Поступци имобилизације произведене лаказе;
- Поступак разградње боја и антибиотика имобилисаном лаказом;

Сви резултати до којих се буде дошло, уз одговарајућу детаљну анализу и дискусију, биће систематски представљени у поглављу **Резултати и дискусија**. У том смислу, ово поглавље садржаће:

- Резултате молекуларне идентификације гљива белог труљења;
- Резултате квалитативних и квантитативних тестова у поступку одређивања ензимског потенцијала новоидентификованих сојева гљива;
- Анализу оптимизације процеса производње, екстракције и пречишћавања лаказе;
- Резултате одређивања лаказне активности, оптималних услова, стимулатора и инхибитора исте, као и кинетике;
- Резултате карактеризације лаказе полиакриламидном електрофорезом;
- Анализу оптимизације поступка разградње боја текстилне индустрије и отпадне синтетичке текстилне воде-оптимална температура, рН, концентрација боје и ензима, време трајања разградње;
- Анализу оптимизације поступка разградње антибиотика тетрациклина-концентрација ензима и антибиотика, време трајања разградње под оптималном температуром и рН;
- Резултате идентификације производа разградње боја и антибиотика;
- Резултате одређивања антимикуробне активности добијених производа разградње боја и антибиотика;
- Резултате одређивања фитотоксичности производа разградње боја;
- Резултате имобилизације произведене лаказе;
- Резултате разградње боја и антибиотика имобилисаном лаказом;

У **Закључку** биће сумирани сви најважнији закључци проистекли из експерименталног рада и анализе добијених резултата у оквиру ове дисертације.

Литература која ће бити коришћена током израде докторске дисертације ће бити наведена у поглављу **Литература**.

7. Закључак и предлог

На основу изнетих података, Комисија сматра да кандидат Невена В. Илић, мастер инжењер технологије, испуњава све услове за израду предложене докторске дисертације. Предмет, циљеви, методе, актуелност и значај теме су добро дефинисани и научно засновани. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да одобри израду докторске дисертације: „ **Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре**“. За ментора се предлаже др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета у Београду. Истраживања у оквиру ове

дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа.

У Београду, 17.12.2021.године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор

Универзитета у Београду,

Технолошко-металуршки факултет

др Дејан Безбрадица, редовни професор

Универзитета у Београду,

Технолошко-металуршки факултет

др Мирјана Рајилић-Стојановић, доцент

Универзитета у Београду,

Технолошко-металуршки факултет

др Катарина Михајловски, научни сарадник

Универзитета у Београду,

Технолошко-металуршки факултет

Др Анета Бунтић, научни сарадник

Институт за земљиште, Београд
