

Образац 3.

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/167

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

30.06.2022.

(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:

Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених
комбинованим третманима нетермалном плазмом

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Јована (Здравко) Грбић

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: 2019.
-

4. Година уписа на докторске студије: 2019.
-

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ :

Име и презиме ментора: Др Александра Ђукић-Вуковић

Звање: доцент

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Djukić-Vuković, A., Mladenović, D., Ivanović, J., Pejin, J., & Mojović, L. (2019). Towards sustainability of lactic acid and poly-lactic acid polymers production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 108, 238-252. ISSN 1363-0321 (IF=12,111)
2. Djukić-Vuković, A. P., Mojović, L. V., Jokić, B. M., Nikolić, S. B., & Pejin, J. D. (2013). Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Bioresource technology*, 135, 454-458. ISSN 0960-8524 (IF=5,039)
3. Djukić-Vuković, A., Lazović, S., Mladenović, D., Knežević-Jugović, Z., Pejin, J., & Mojović, L. (2019). Non-thermal plasma and ultrasound-assisted open lactic acid fermentation of distillery stillage. *Environmental Science and Pollution Research*, ISSN 0944-1344 26(35), 35543-35554. (IF=3,056)
4. Djukić-Vuković, A., Meglič, S. H., Flisar, K., Mojović, L., & Miklavčič, D. (2021). Pulsed electric field treatment of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei*, bacteria with probiotic potential. *LWT*, 152, 112304. ISSN 0023-6438 (IF=4,952)
5. Djekic, I., Sanjuán, N., Clemente, G., Jambrak, A. R., Djukić-Vuković, A., Brodnjak, U. V., Pop, E., Thomopoulos, R., & Tonda, A. (2018). Review on environmental models in the food chain-Current status and future perspectives. *Journal of Cleaner Production*, 176, 1012-1025. ISSN 0959-6526 (IF=6,395)

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

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 30.06.2022. 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 **Јоване Грбић**, број индекса 4024/2019, под називом: „**Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених комбинованим третманима нетермалном плазмом**“.

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

За ментора се одређује др Александра Ђукић-Вуковић, доцент 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

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Предмет: Подобност теме и кандидата Јоване Грбић, мастер инжењера технологије, за израду докторске дисертације.

Одлуком бр. 35/57 од 02.06.2022. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Јоване (Здравко) Грбић за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом:

**„Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених
комбинованим третманима нетермалном плазмом“**

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Јована З. Грбић, мастер инж. технологије, рођена је 07.03.1994. године у Београду. Основну школу и Десету гимназију „Михајло Пупин“ завршила је у Београду са одличним успехом. Школске 2013/2014. уписала је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Основне академске студије завршила је у септембру 2018. године, одбраном завршног рада „Производња пробиотске биомасе *Bacillus licheniformis* на воденим екстрактима микроалге *Chlorella vulgaris*“ под менторством проф. др Љиљане Мојовић са оценом 10 и просечном оценом током студија 8,33.

Мастер академске студије уписала је школске 2018/2019. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Прехрамбена биотехнологија. Завршни рад са оценом 10 одбранила је у септембру 2019. године под менторством проф. др Љиљане Мојовић на тему „Испитивање поступака екстракције и пречишћавања ектополисахарида *Lactobacillus salivarius*“ и завршила мастер студије са просечном оценом 9,22.

По завршетку мастер студија уписала је докторске студије на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, под менторством др Александре Ђукић-Вуковић, доцента Технолошко-металуршког факултета. Од јануара 2020. запослена је као истраживач приправник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета. Као студент докторских студија, радила је са студентима основних и мастер студија на изради три завршна и четири мастер рада.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Јована Грбић је школске 2019/2020. године уписала докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,82 (девет и 82/100). Завршни испит одбранила је са оценом 10.

Редни број	Назив предмета	Оцена	ЕСПБ
1.	Феномени преноса у биолошким системима	10	5
2.	Хемијска кинетика	8	5
3.	Биоактивне материје у козметичким производима	10	4
4.	Одабрана поглавља пројектовања процеса у биохемијском инжењерству	10	5
5.	Одабрана поглавља инструменталне анализе	10	7
6.	Одабрана поглавља технологије микробне биомасе	10	5
7.	Одабрана поглавља биохемије - витамини	10	5
8.	Биомаса као извор енергије	10	4
9.	Инжењерство ћелије	10	5
10.	Одабрана поглавља нумеричке анализе	10	5
11.	Енглески језик	10	/
12.	Завршни испит	10	30
Просечна оцена/Збир бодова		9,82	80

У досадашњем научноистраживачком раду објавила је један рад у врхунском часопису националног значаја (M51), три саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34) и два саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу (M64).

Списак објављених научних и стручних радова

1. Радови у часописима националног значаја (M50)

Рад у врхунском часопису националног значаја (M51)

1. J. Grbić, A. Đukić-Vuković, D. Mladenović, S. Lazović, L. Mojović, *Effect of non-thermal plasma on cellulose crystallinity and lignin content in corn stalks*. Journal on Processing and Energy in Agriculture. (2022) ISSN: 1821-4487, у штампани.

2. Зборници међународних научних скупова (M30)

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

1. A. Đukić-Vuković, D. Mladenović, J. Grbić, S. Lazović, J. Pejin, S. Kocić-Tanackov, L. Mojović, *Non-thermal plasma treatment of corn stalks examined by light microscopy*. (2021) 7th International conference on Sustainable postharvest and food technologies - INOPTER 2021, Vršac, Serbia. Book of Abstracts, page 29, ISBN: 978-86-7520-531-9 (April 18th-23rd 2021).
2. A. Đukić-Vuković, J. Grbić, D. Mladenović, S. Lazović, L. Mojović, *Advanced oxidation processes in treatment of agricultural biomass residues*. (2022) 9th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, Corfu, National Technical University of Athens, NTUA (June 15th-18th 2022).
3. D. Mladenović, J. Grbić, A. Đukić-Vuković, L. Mojović, *Improvement of enzymatic saccharification of corn cob by microwave-assisted peroxide treatment*. (2022) 9th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, Corfu, National Technical University of Athens, NTUA (June 15th-18th 2022).

3. Предавања по позиву на скуповима националног значаја (M60)

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

1. A. Đukić-Vuković, M. Bogdanović, J. Grbić, D. Mladenović, L. Mojović, *Common nettle as substrate for the growth of Lacticaseibacillus sp. and Ligilactobacillus sp.* (2022) 34th Scientific-Professional conference with international participation on Process technology and energy in Agriculture – PTEP 2022, Sokobanja, Serbia (April 3rd-8th 2022).
2. D. Mladenović, J. Grbić, A. Đukić-Vuković, J. Pejin, L. Mojović, Karakteristike čelijskog zida kukuruzne biomase nakon oksidativnog tretmana, Zbornik izvoda XXXIV Nacionalne konferencije sa međunarodnim učešćem „Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi - PTEP 2022“ (April 3rd-8th 2022) ISBN: 978-86-7520-550-0.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

У свом досадашњем ангажовању током докторских студија и у оквиру научноистраживачког рада, Јована Грбић, мастер инжењер технологије, показала је интересовање за изучавањем нових биотехнолошких метода којима би се поспешила валоризација биомасе. У свом досадашњем раду, кандидаткиња показује посвећеност, темељност и способност критичког мишљења. У прилог томе говоре и до сада постигнути резултати.

Из области којој припада предложена тема докторске дисертације, кандидаткиња је до сада објавила један рад као аутор у врхунском часопису националног значаја (M51), а као коаутор три саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34) и два саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу (M64). На основу приказа резултата досадашњег рада и личног контакта са кандидаткињом, Комисија сматра да Јована Грбић, мастер инжењер технологије, испуњава услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је добијање фракција лигноцелулозне биомасе применом нетермалне гасне плазме и њихово искоришћење у различитим биотехнолошким поступцима, са циљем оптимизације еколошки прихватљивих, „зелених“ поступака искоришћења лигноцелулозне биомасе.

Пољопривредна индустрија представља једну од најважнијих грана привреде, која је доживела велику експанзију последњих педесет година због повећане потребе за храном, услед демографске експанзије и развоја технологија за производњу и прераду пољопривредних култура. Поред пораста производње хране, последњих неколико деценија обележила је и производња прве генерација биогорива на житарицама. Истовремена потреба за храном, али и за горивом добијеним из сировина за производњу хране доводи до одређене конкуренције ова два процеса. Проблем је препознат и кроз правне нормативе код нас и у свету, а кроз које се инсистира на рационалном и одрживом коришћењу ресурса, уз стимулацију коришћења отпада и споредних производа у складу са принципима циркуларне економије. Приоритет се даје смањењу отпада и валоризацији кроз биорафинеријске поступке добијања високо вредних додатака исхрани, нутрицеутика, фармацеутика, градивних јединица бројних једињења и на крају биогорива.

Упркос прописаним нормама, велика количина отпада који заостаје након жетве се и даље уклања са обрадивих површина спаљивањем или непрописним одлагањем, а ради се о значајној количини ресурса. Резерве биомасе у свету данас износе око 1.8 трилиона тона. У Србији је процењено да биомаса има највећи потенцијал од свих обновљивих извора енергије, са уделом од 61%. Највећи део ових резерви потиче од пољопривреде (остаци у ратарству, воћарству, виноградарству, примарној преради воћа и сточарству). У овом раду ће као модел супстрат бити коришћена кукурузна стабљика, будући да је кукуруз једна од најважнијих и најраспрострањенијих житарица широм света. Годишњи принос кукуруза на светском нивоу износи око 5,76 t/ha, а у Србији је само прошле године произведено 7,87 милиона тона кукуруза. Након убирања клипа и уклањања зрна – јединог јестивог дела кукуруза, надземни

део биљке (кукурузна стабљика, окласак, лишће) заостаје као отпад. Процењује се да вегетативни део који заостаје након жетве, а у коме кукурузна стабљика има највећи удео, чини око 70% целе биљке. Због великог приноса и обновљивости на годишњем нивоу, генеришу се велике количине овог отпада, те је неопходно пронаћи нове начине за његово искоришћење.

Кукурузна стабљика спада у примарни агро-индустријски отпад. Захваљујући комплексном хемијском саставу, који укључује висок садржај угљених хидрата, може се користити као супстрат у производњи секундарних метаболита, витамина, ензима, органских киселина и олигосахарида, као сточна храна, подлога за раст печурака и као медијум у бројним ферментационим процесима тј. алтернативни извор шећера у производњи биогаза, биогорива или биођубрива и сл. Састоји се из три основне компоненте: целулозе, хемицелулозе и лигнина и као таква спада у лигноцелулозну биомасу. Њена употреба у наведеним процесима у односу на сировине на бази моно- и дисахарида и скроба је економски повољнија, јер се не користи у исхрани људи, и представља споредни производ у производњи хране. Ограничење у њеној примени представља захтевна прерада која је последица сложене хемијске структуре и снажних веза међу полимерним молекулима присутним у биомаси.

Како би се боље валоризовала лигноцелулозна биомаса користе се конвенционалне методе, било физичке, хемијске или физичко-хемијске. Оне могу да разграде компоненте лигноцелулозе на мање фрагменте, али су енергетски и хемијски интензивни. Осим тога, током ових третмана настају различити споредни производи попут фурфурала и хидроксиметилфурфурала који инхибиторно делују на микроорганизме и ензиме у биотехнолошким поступцима у којима би се користила третирана биомаса. Реагенси који се користе у хемијским методама имају неповољан утицај на животну средину, а њихово правилно третирање и одлагање након третмана изискује додатан утрошак енергије, воде и новца. Због ових ограничења, ради се на развијању нових еколошки оправданих третмана веће ефикасности у које спада и третман гасном плазмом.

Третман нетермалном гасном плазмом је метода која се заснива на стварању електричног гасног пражњења на атмосферском притиску. При овако генерисаном пражњењу долази до формирања различитих кисеоничних (O_3 , H_2O_2 , $\cdot OH$ и др.) и азотних (NO_x , нитрати, нитрити и др.) реактивних врста. Које ће реактивне врсте настати и како ће оне реаговати са третираном узорцима, зависи од више фактора, укључујући трајање третмана, растојање извора пражњења од површине третираног материјала, типа употребљених електрода, радног гаса, снаге и врсте електричног напајања и др. Настале реактивне врсте имају способност модификације површине материјала који се третира, а запажена је и антимикробна активност, што омогућава примену овог третмана у различите сврхе. Третман нетермалном плазмом се већ користи за пречишћавање отпадних вода, стерилизацију прехранбених производа и третирање ћелија и ткива сисара, а показује и велики потенцијал у разлагању лигноцелулозне биомасе. Главни недостатак овог третмана је велики утрошак енергије за постизање значајне разградње лигноцелулозе уколико се плазма користи самостално. Како би процес био енергетски повољнији, у реакциону смешу се могу додавати различити хомогени (Fe^{2+} , Fe^{3+}) и хетерогени (нелегирани оксиди метала) катализатори ради интензивнијег настајања озона и водоник пероксида.

У овом раду биће испитана могућност комбиновања различитих оксидационих и ензимских поступака разградње лигноцелулозне биомасе са третманима нетермалном плазмом у конфигурацији плазма игле (а по потреби и у другим конфигурацијама). Напредни оксидациони процеси се заснивају на стварању високо реактивних радикалских врста, било кисеоничних или азотних. Ови радикали настају употребом водоник пероксида, озона, фотокатализатора или других оксиданата, у зависности од типа примењеног процеса. Неки од најчешће коришћених оксидационих процеса су озонизација, Фентон и фото-Фентон процеси, третман ултразвуком, фотокаталитички процеси са употребом катализатора TiO_2 , као и комбиновани O_3/H_2O_2 и $UV/O_3/H_2O_2$ третмани, при чему се Фентон и фото-Фентон процеси издвајају као најједноставнији и економски и еколошки најприхватљивији. Фентон процес

подразумева примену Фентоновог реагенса који се састоји из водоник пероксида и јона гвожђа (Fe^{2+} или Fe^{3+}). Иако овај процес није енергетски захтеван, а услови реакције су благи, ограничење у његовој примени представља дужина трајања услед мале количине присутног водоник пероксида. У раду ће бити испитан утицај нетермалне плазме на ефикасност овог процеса. Осим тога, анализираће се и могућност употребе Фентоновог реагенса као потенцијалног катализатора у реакцији деградације лигноцелулозе током третмана плазмом. Лигнолитички ензими, попут неких пероксидаза (манган, лигнин и версатилне пероксидазе) и лаказа захтевају присуство водоник пероксида за свој каталитички циклус. Уколико је присутан у већим количинама, екстерни водоник пероксид који се конвенционално додаје може имати инхибиторно дејство на ове енземе. Стога ће се разматрати могућност употребе нетермалне плазма игле мале снаге која има способност генерисања водоник пероксида *in situ*. Такође, биће испитан утицај овако генерисаног водоник пероксида, као и осталих реактивних врста које током третмана настају, на активност комерцијалне манган пероксидазе. Осим тога, примениће се и комбиновани ензимски препарати (попут манган пероксидаза-лаказа коктеља) како би се унапредило искоришћење добијених фракција.

Основни циљ истраживања ове докторске дисертације представља оптимизација процеса разградње отпадне лигноцелулозна биомасе кукуруза оправданог са аспекта заштите животне средине и могућности искоришћења добијених фракција у биотехнолошким поступцима. Биће извршена оптимизација процесних параметара третмана лигноцелулозе потпомогнутих нетермалном плазмом, након чега ће уследити карактеризација добијених фракција лигноцелулозне биомасе (лигнинске и угљено-хидратне компоненте). Испитаће се ензимска хидролиза добијене угљено-хидратне фракције као и погодност добијених хидролизата као извора угљеника у ферментационим процесима.

Релевантни библиографски извори повезани са предметом истраживања ове докторске дисертације, који уједно представљају и полазну основу за даљи ток истраживања су:

Abdel- Hamid, A.M., Solbiati, J.O., *Insights into lignin degradation and its potential industrial applications*. (2013) *Advances in Applied Microbiology*, 82: 2-21.

Asgher, M., Ahmad, Z., Iqbal, H.M.N., *Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production*. (2013) *Industrial Crops and Products*, 44: 488-495.

Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., Banu, J. R., Rao, C. V., Kim, Y. G., Yang, Y. H., *Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges*. (2020) *Bioresource Technology*, 300.

Chowdhary, P., Shukla, G., Raj, G., Ferreira, L.F.R., Bharagava, R.N., *Microbial manganese peroxidase: a lignolytic enzyme and its ample opportunities in research*. (2019) *SN Applied Sciences*, 1:45.

Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R. S., Formanek, P., *Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review*. (2017) *Sustainability*, 9, 1163.

Đukić-Vuković, A., Tylewicz, U., Mojović, L., and Gusbeth, C. *Recent advances in pulsed electric field and non-thermal plasma treatments for food and biorefinery applications*. (2017) *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 21(2), 61–65.

European Commission, *The European Green Deal*. (2019) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM%3A2019%3A640%3AFIN>.

Final Conference UNDP/GEF Project: Reducing Barriers to Accelerate the Development of Biomass Markets in Serbia. March 2019.

Ho., M.C., Ong, V.Z., Wu, T.Y., *Potential use of alkaline hydrogen peroxide in lignocellulosic biomass pretreatment and valorization – A review*. (2019) *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112: 75-86.

Horfrichter, M., *Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)*. (2002) *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 454-466.

- Huang, C., Jiang, X., Shen, X., Hu, J., Tang, W., Wu, X., Ragauskas, A., Jameel, H., Meng, X., Yong, Q., *Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics*. (2022) *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154.
- Lim, M., Zulkifli, A.Z.S., *Investigation of biomass surface modification using non-thermal plasma treatment*. (2018) *Plasma Science and Technology*, 20.
- Lukes, P., Locke, B. R., Brisset, J. L., *Aqueous-phase chemistry of electrical discharge plasma in water and in gas-liquid environments*. (2012) *Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids*, 241-307.
- Miranda, F. S., Rabelo, S. C., Pradella, J. G. C., Carli, C. Di, Petraconi, G., Maciel, H. S., et al., *Plasma in-liquid using non-contact electrodes: A method of pretreatment to enhance the enzymatic hydrolysis of biomass*. (2019) *Waste and Biomass Valorization*, 1-11.
- Pereira, G. N., Cesca, K., Cubas, A. L. V., de Oliveira, D., *Use of non-thermal plasma in lignocellulosic materials: A smart alternative*. (2021) *Trends in Food Science & Technology*, 109: 365-373.
- Ravindran, R., Sarangapani, C., Jaiswal, S., Cullen, P. J., and Jaiswal, A. K. *Ferric chloride assisted plasma pretreatment of lignocellulose*. (2017) *Bioresource Technology*, 243, 327–334.
- Ravindran, R., Sarangapani, C., Jaiswal, S., Lu, P., Cullen, P. J., Bourke, P., et al., *Improving enzymatic hydrolysis of brewer spent grain with nonthermal plasma*. (2019) *Bioresource Technology*, 282: 520-524.
- Republički zavod za statistiku Republike Srbije, *Ostvarena proizvodnja pšenice i ranog voća i očekivani prinosi kasnih useva, voća i grožđa, 2021*. Septembar 2021, Vol. 261.
- Statista. <https://www.statista.com/statistics/254292/global-corn-production-by-country/>
- WBA 2018. *WBA Global bioenergy statistics 2018. Summary Report*. World Bioenergy Association, www.worldenergy.org
- Woolridge, E., *Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass*. (2014) *Catalysts*, 4: 1-35.
- Zeng, G., Zhao, M., Huang, D., Lai, C., Huang, C., Wei, Z., Xu, P., Li, N., Zhang, C., Li, F., Cheng, M., *Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from Phanerochaete chrysosporium responsible for lignin biodegradation*. (2013) *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85: 166-172.
- Zhang, S., Xiao, J., Wang, G., Chen, G., *Enzymatic hydrolysis of lignin by lignolytic enzymes and analysis of the hydrolyzed lignin products*. (2020) *Bioresource Technology*, 304.
- Zhao, X., Meng, X., Ragauskas, A.J., Lai, C., Ling, Z., Huang, C., Yong, Q., *Unlocking the secret of lignin-enzyme interactions: Recent advances in developing state-of-the-art analytical techniques*. (2022) 54.
- Zhao, Y.Y., Wang, T., Wilson, M.P., MacGregor, S.J., Timoshkin, I.V., Ren, Q.C., *Hydroxyl radicals and hydrogen peroxide formation at nonthermal plasma-water interface*. (2016) *IEEE Transactions on Plasma Science*, 44: 2084-2091.
- Zhou, R., Zhou, R., Wang, S., Ekanayake, U.G.M., Fang, Z., Cullen, P.J., Bazaka, K., Ostrikov, K., *Power-to-chemicals: Low temperature plasma for lignin depolymerisation in ethanol*. (2020) *Bioresource Technology*, 318.

3. Полазне хипотезе

Највећи изазови у искоришћењу лигноцелулозе данас су у раскидању снажних веза између лигнинских структура (полимерно ароматично једињење) и угљено-хидратних компонената (полимери хемицелулозе и целулозе). Угљено-хидратна компонента је извор моносахарида, дисахарида и олигосахарида које користе микроорганизми у ферментационим поступцима, док лигнинска фракција представља извор градивних јединица за биолошки активна једињења. Лигнинска компонента отежава приступ целулолитичким ензимима, док у конвенционалним поступцима примене киселине и базе за разградњу лигнина настају инхибитори ензима, односно долази и до значајне разградње и губитка угљених хидрата. Тренутно коришћени

напредни оксидативни поступци су релативно неефикасни и недовољно селективни у раздвајању ових фракција. Уз то, третмани се углавном морају вршити на повишеној температури у току дужег временског периода. Сваки од ових процеса обухвата генерисање кисеоничних радикала и водоник пероксида, који реагују са лигнинском компонентом и доведе до деградације под одговарајућим условима. Поред хемијских, и биолошки поступци помоћу гљива такође подразумевају генерисање водоник пероксида у лигнолитичком циклусу, али су изузетно спори. Наиме, гљиве у току раста на лигноцелулозним супстратима производе лигнолитичке ензиме (манган, версатилна и лигнин пероксидаза и лаказе) као и *in situ* водоник пероксид док угљенохидратна компонента може остати и значајно очувана у зависности од гљиве.

Нетермална плазма игла као *in situ* извор радикала ће бити комбинована са конвенционалним техникама разградње лигноцелулозне биомасе као што су Фентон реакција и третман алкалним пероксидом у циљу повећања ефикасности. Извршиће се карактеризација добијених фракција и утврдити оптимални услови третмана за добијање угљено-хидратне фракције погодне за ензимску хидролизу и даљу ферментацију. Очекивано је да плазма третман значајно утиче на физичко-хемијска својства добијених фибрила, кристалиничност целулозе, адсорпцију ензима током ензимске хидролизе до ферментационих шећера, принос итд. Лигинска фракција ће бити карактерисана и са аспекта антиоксидативне и антимицробне активности. Циљ је такође испитати примену нетермалне плазме као извора радикала и пероксида у комбинацији са лигнолитичким ензимским третманом. Овим третманом би се избегло додавање пероксида у вишку, који је неопходан у конвенционалним третманима, а може деловати инхибиторно на ензим.

4. Научне методе истраживања

У поступку реализације научних резултата у оквиру ове докторске дисертације најпре ће се извршити карактеризација плазма активiranог супстрата при различитим хидромодулима и дужинама трајања третмана. Карактеризација овако добијеног воденог медијума ће подразумевати спектрофотометријско одређивање садржаја водоник пероксида (методом са титанијум оксисулфатом) и хидроксил радикала (методом са терефталном киселином) генерисаних током третмана и праћењем промене рН вредности. За третмане ће бити коришћена нетермална плазма игла, са аргоном као носећим гасом.

Алкални третман лигноцелулозне биомасе вршиће се применом алкалног раствора водоник пероксида. Како би се испитао утицај плазма игле, биће постављена два сета узорак, при чему ће један сет бити подвргнут алкалном третману, док ће други сет, поред алкалног раствора водоник пероксида, подразумевати и упоредни третман нетермалном плазмом, уз мешање и загревање. Оптимизација третмана вршиће се варирањем процесних параметара – температуре, дужине трајања третмана, као и односа биомасе и употребљеног раствора водоник пероксида.

Третман кукурузне стабљике Фентоновим реагенсом засниваће се на додавању водоник пероксида и соли гвожђа у водени супстрат. Испитаће се утицај нетермалне плазме на супстрат који је третиран пре и након додатка соли гвожђа. Упоредо ће бити постављен и узорак на који ће се деловати само Фентоновим реагенсом. Такође, биће испитан ефекат различитих соли гвожђа на разградњу биомасе, као и различитих састава Фентоновог реагенса. Оптимални услови за одвијање Фентон реакције утврдиће се након варирања дужине трајања третмана плазмом, дужине трајања и температуре на којој се одвија сама реакција и хидромодула лигноцелулозног супстрата.

Ензимски третман лигноцелулозе подразумеваће употребу комерцијалне манган пероксидазе, изоловане из гљиве изазивача белог труљења рода *Phanerochaete chrysosporium* (Sigma Aldrich). Најпре ће бити испитан утицај плазма активirane воде на активност ензима. Затим ће се водени супстрати кукурузне стабљике третирати нетермалном плазмом, како би се генерисала довољна количина водоник пероксида неопходна за каталитички циклус манган

пероксидазе. Потом ће се испитати могућност *in situ* третмана нетермалном плазмом при различитим конфигурацијама. Осим манган пероксидазе, пратиће се и ефекат примене комбинованих ензимских препарата (манган пероксидаза-лаказа и др.) на процес делигнификације кукурузне стабљике. У циљу оптимизације ензимског третмана, биће праћен утицај промене процесних параметара (pH, температуре, концентрације генерисаног водоник пероксида, ензима и лигноцелулозног супстрата) на активност манган пероксидазе.

Из супернатанта ће се одредити садржај редукујућих шећера ослобођених током третмана, применом течне хроматографије високих перформанси (HPLC) и спектрофотометријске методе са 3,5-динитросалицилном киселином у зависности од фазе испитивања. Промене у садржају лигнина ће се одредити спектрофотометријски, методом са ацетил бромидом, док ће се промене у структури третиране биомасе пратити применом скенирајуће електронске микроскопије (SEM), рендгенске дифракције (XRD) и Фуријеове трансформисане инфрацрвене спектроскопије (FT-IR).

Након карактеризације добијених лигнинских и угљено-хидратних фракција, испитаће се могућност њиховог искоришћења. Лигнинске фракције ће бити окарактерисане са аспекта биолошке активности, спектрофотометријским методама за антиоксидативну активност (ABTS, DPPH) и антимикуробну активност (микродилуциони тест са више тест микроорганизама). Могућност искоришћења угљено-хидратне фракције ће бити испитана кроз ензимску хидролизу комерцијалним целулазама (Cellic CTec 2), а потом у ферментационим процесима (алкохолна ферментација, млечно-киселинска ферментација).

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да научни допринос ове докторске дисертације обухвати:

- Повећање ефикасности разградње отпадне лигноцелулозне биомасе кукуруза у односу на конвенционалне технике као што су Фентон реакција или третман алкалним пероксидом.
- Оптимизацију примене нетермалне плазме као извора радикала и пероксида за ефикасан лигнолитички ензимски третман без инхибиције пероксидом. Инхибиција пероксидом је недостатак у стандардном поступку где је неопходан додатак вишка водоник пероксида као извора радикала.
- Успостављање комбинованих поступака са нетермалном плазмом уз повећану селективност према лигнинској односно угљено-хидратној фракцији у зависности од услова третмана, према критеријуму максималног процента делигнификације угљенохидратне фракције, односно максималног степена искоришћења третиране биомасе.
- Производњом и детаљном карактеризацијом добијених фракција ће се одабрати најбољи биотехнолошки поступци валоризације, у складу са принципима циркуларне економије што представља један од највећих тренутних изазова у биоeкономији.
- Унапређени поступак ће омогућити валоризације више фракција. Имајући у виду количину доступне лигноцелулозне биомасе у свету, као и мали степен њеног искоришћења тренутно, развијени поступак може имати економски и еколошки значај глобално.

6. План истраживања и структура рада

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације ће се односити на искоришћење фракција отпадне лигноцелулозне биомасе кукуруза добијених у комбинованим третманима са нетермалном плазмом. Уједно ће се извршити и оптимизација третмана коришћених за разградњу лигноцелулозне биомасе који су потпомогнути третманом нетермалном гасном плазмом.

У складу са претпостављеним планом, у докторској дисертацији ће бити обрађена следећа поглавља: *Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература.*

У поглављу *Увод* биће дефинисан предмет и значај теме истраживања ове дисертације, актуелност проблематике, потенцијални допринос и главни циљеви истраживања.

Теоријски део представљаће преглед литературе у оквиру досадашњих истраживања на тему третмана за разградњу лигноцелулозне биомасе, уз посебан осврт на оксидационе и ензимске третмане. Биће дат и преглед до сада коришћених третмана потпомогнутих нетермалном плазмом и могућност њихове оптимизације. Осим тога, биће наведене актуелне примене лигноцелулозне биомасе као и литературно описани примери валоризације фракција добијених из лигноцелулозне биомасе за примену у биотехнологији.

У оквиру *Експерименталног дела* описаће се поступци коришћени за третман кукурузне стабљике као модел супстрата на бази лигноцелулозе. Биће наведен и процес оптимизације ових поступака, као и карактеризације добијених фракција. Тако ће ово поглавље садржати опис:

- материјала коришћених током истраживања у оквиру израде докторске дисертације;
- опреме коришћене за експериментална истраживања;
- техника и метода неопходних за извођење експеримената;
- поступка и оптимизације алкалног третмана лигноцелулозе потпомогнутог нетермалном плазма иглом;
- поступка и оптимизације ензимског третмана лигноцелулозе потпомогнутог нетермалном плазма иглом;
- поступка и оптимизације оксидационих третмана (Фентон процес, Nanozymes, нетермална плазма и др.);
- метода за карактеризацију добијених фракција лигноцелулозне биомасе (лигнина и угљено-хидратних компоненти);
- метода за испитивање могућности искоришћења угљено-хидратне фракције.

Поглавље *Резултати и дискусија* подразумеваће приказ и дискусију резултата добијених током експерименталног рада. Оптимизацијом поступака за разградњу лигноцелулозне биомасе комбинованих са третманом нетермалном плазмом биће одабрани параметри процеса при којима се постиже најефикаснија разградња лигноцелулозе према критеријуму производње пречишћене угљено-хидратне фракције. Добијене фракције ће бити окarakterисане и биће испитани најповољнији поступци за њихово искоришћење у биотехнологији – као супстрата у ферментационим поступцима, супстрата за производњу ексципијенса и биолошки активних једињења и сл. Добијени резултати ће бити поређени са релевантним подацима доступним у научној литератури, на основу чега ће бити донети одговарајући закључци о потенцијалној примени плазма потпомогнутих поступака за разградњу лигноцелулозне биомасе. Ово поглавље ће садржати приказ и дискусију следећих експеримената:

- оптимизација алкалног третмана лигноцелулозе потпомогнутог нетермалном плазма иглом;
- оптимизација ензимског третмана лигноцелулозе потпомогнутог нетермалном плазма иглом;
- оптимизација оксидационих третмана и њихових комбинација (нетермална плазма, алкални пероксид, Фентон и др.);
- карактеризација супстрата након третмана (применом Фуријеове трансформисане инфрацрвене спектроскопије (FT-IR), рендгенске дифракције (XRD), скенирајуће електронске микроскопије (SEM), течне хроматографије високих перформанси (HPLC), гравиметријским и спектрофотометријским методама за праћење садржаја влакана и лигнина);
- карактеризација лигнинске фракције са аспекта биолошке активности
- валоризација угљено хидратне фракције кроз ензимску хидролизу и ферментационе процесе
- извршиће се анализа и процена важних еколошких и економских аспеката развијених третмана у циљу процене потенцијала за ширу примену.

У *Закључку* ће сумарно бити представљени резултати добијени на основу наведених истраживања, са акцентом на значај примене третмана нетермалном плазмом у комбинацији са оксидационим и ензимским поступцима за разградњу лигноцелулозне биомасе.

Поглавље *Литература* ће се састојати из литературних навода цитираних у докторској дисертацији, укључујући и публиковане радове настале током истраживања у оквиру израде ове докторске дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног, Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације кандидата **Јоване Грбић** под називом **„Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених комбинованим третманима нетермалном плазмом“** научно заснована и предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да прихвати и одобри израду докторске дисертације под наведеним називом. Комисија сматра да је кандидат подобан за реализацију циљева истраживања докторске дисертације. Такође, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду упути захтев за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. За ментора се предлаже др Александра Ђукић-Вуковић, доцент Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду.

У Београду, 23.06.2022. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Александра Ђукић-Вуковић, доцент
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Љиљана Мојовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Саша Лазовић, научни саветник
Универзитета у Београду, Институт за физику Београд

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Драгана Младеновић, научни сарадник
Универзитета у Београду, Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета