

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/339

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

12.1.2023.

(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 и потенцијал ксиланазе из *Thermomyces lanuginosus* за разградњу биљног
отпада и добијање функционалних олигосахарида**

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ: ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

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

Јелена (Весна) Бакрач

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 Зорица Кнежевић Југовић

Звање: редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Gazikalović, I., Mijalković, J., Šekuljica, N., Tanasković, S.J., Vuković, A.Đ., Mojović, L., **Knežević-Jugović, Z.**, Synergistic effect of enzyme hydrolysis and microwave reactor pretreatment as an efficient procedure for gluten content reduction (2021) *Foods*, 10 (9), art. no. 2214. ISSN: 2304-8158; IF(2021) 5,561. DOI: 10.3390/foods10092214.
2. Tanasković, S.J., Šekuljica, N., Jovanović, J., Gazikalović, I., Grbavčić, S., Đorđević, N., Sekulić, M.V., Hao, J., Luković, N., **Knežević-Jugović, Z.** Upgrading of valuable food component contents and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition (2021) *Journal of Cereal Science*, 99, art. no. 103159. ISSN: 0733-5210; IF(2021) 4,075. DOI: 10.1016/j.jcs.2020.103159
3. Perović, M.N., **Knežević Jugović, Z.D.**, Antov, M.G. Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction (2020) *Journal of Food Engineering*, 276, art. no. 109894. ISSN: 0260-8774; IF(2020) 5,354. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109894
4. 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 (2018) 4,191. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.05.078
5. 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. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.12.081

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф.дрПетарУскоковћ

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 29.12.2022. 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 **Јелене Бакрач**, број индекса 4013/19, под називом: „**Производња и потенцијал ксиланазе из *Thermomyces lanuginosus* за разградњу биљног отпада и добијање функционалних олигосахарида**“.

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

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

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

Предмет: Подобност теме и кандидата Јелене Бакрач, мастер инжењера технологије, за израду докторске дисертације.

Одлуком број 35/272 од 22.11.2022. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Јелене (Миодраг) Бакрач за израду докторске дисертације и научне заснованости теме под називом:

„Производња и потенцијал ксиланазе из *Thermomyces lanuginosus* за разградњу биљног отпада и добијање функционалних олигосахарида“

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Јелена М. Бакрач, мастер инжењер технологије, рођена је у Београду 18.04.1989. године. Школовање је започела у основној школи „Војвода Мишић“ у Београду, где је била ђак генерације, а наставила у Трећој београдској гимназији на природно-математичком смеру. Школске 2013/14 године уписује Технолошко-металуршки факултет на Универзитету у Београду. Основне академске студије на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија, завршила је 2018. године са просечном оценом 8,86 одбравивши дипломски рад на тему „Ензимска хидролиза протеина козијег млека“ са оценом 10. Мастер студије на Технолошко-металуршком факултету уписала је школске 2018/19 године на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија и завршила у септембру 2019. године са просечном оценом 9,75. Мастер рад на тему „Модификација пшеничног глутена применом микроталаса у циљу смањења алергених својстава“ одбранила је оценом 10 под менторством професорке др Зорице Кнежевић-Југовић.

Докторске студије на Технолошко-металуршком факултету уписала је школске 2019/20 године такође на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија под менторством професорке др Зорице Кнежевић-Југовић. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,83, укључујући Енглески језик и Завршни испит под називом „Производња ксиланаза субмерзним поступком помоћу *Thermomyces lanuginosus* на пшеничним мекињама“ са оценом 10 (десет).

Изабрана је у звање истраживач приправник 30.јануара 2020. године, а од фебруара 2020. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду. Била је ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије, под називом: „Развој нових инкапсулационих и ензимских

технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ - ИИИ 46010 и тренутно је ангажована на програмским истраживањима (451-03-68/2022-14/200135). Активно ради са студентима основних и мастер студија при изради завршних и мастер радова. Служи се енглеским и немачким језиком.

1.2. Стечено научноистраживачко искуство

Јелена М. Бакрач је школске 2019/20 године уписала докторске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,83 (девет и 83/100) и завршни испит је такође одбранила са оценом 10.

Редни број	Назив предмета	Оцена	ЕСПБ
1	Одабрана поглавља нумеричке анализе	9	5
2	Хемијска кинетика	9	5
3	Одабрани микробиолошки процеси у заштити животне средине	10	4
4	Санитарна микробиологија	10	4
5	Биомаса као извор енергије	10	4
6	Одабрана поглавља технологије микробне биомасе	10	5
7	Биохемијска кинетика	10	5
8	Одабрана поглавља биохемије-витамици	10	5
9	Аналогије феномена преноса	10	5
10	Индустријска микробиологија	10	5
11	Менаџмент људских ресурса	10	3
12	Енглески језик	10	/
13	Завршни испит	10	30
Просечна оцена/Збир бодова		9,83	80

Изабрана је у звање истраживач приправник 30.јануара 2020. године, а од фебруара 2020. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду.

У току докторских студија била је ангажована у оквиру пројекта: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања конкурентности, квалитета и безбедности“, пројекат Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. ИИИ 46010, а од 30.јануара 2020. као истраживач-приправник у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду у оквиру програмских истраживања.

У досадашњем научноистраживачком раду објавила је као аутор: један рад у врхунском часопису од националног значаја (М51), као и једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М34). Сви публиковани радови су произашли као резултат ангажовања кандидата у оквиру пројекта финансираног од стране Министарства просвете, науке и

технолошког развоја Републике Србије. Током свог ангажовања учествовала је и у извођењу и изради завршних и мастер радова студената.

Списак објављених научних и стручних радова

1. Зборници међународних научних скупова (М30)

1.1. Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М34)

1. **Jelena Bakrač**, Ivana Gazikalović, Nevena Luković, Jelena Mijalković, Nataša Šekuljica, Zorica Knežević-Jugović, *Production of xylanase using wheat bran by submerged fermentation by Thermomyces lanuginosus*, Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - NUTRICON 2022, Book of Abstracts, Vladimir Kakurinov (editor), 978-608-4565-16-1, Ohrid, Macedonia, 8 - 10. June, 2022, pp. 109-110.

2. Радови у часописима националног значаја (М50)

1.1. Рад у врхунском часопису националног значаја (М51)

1. **Jelena Bakrač**, Ivana Gazikalović, Nevena Luković, Jelena Mijalković, Nataša Šekuljica, Zorica Knežević-Jugović, *Optimization of production of xylanase using wheat bran by submerged fermentation by Thermomyces lanuginosus*, Journal of Hygienic Engineering and Design, Article in press, Vol. 42, March 2023.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

У свом досадашњем ангажовању током докторских студија и у оквиру научно-истраживачког рада на пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Јелена Бакрач, мастер инжењер технологије, је постигла значајне резултате, заинтересованост и стручност за научно-истраживачки рад. Из области којој припада предложена тема докторске дисертације, кандидат је објавио као први аутор један рад у врхунском часопису националног значаја (М51) и као први аутор једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М34). На основу приложених података о кандидату и његовом научноистраживачком раду, Комисија сматра да Јелена Бакрач, мастер инжењер технологије, испуњава услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је производња и примена ксиланазе која се добија из гљиве *Thermomyces lanuginosus* за разградњу биљног отпада и добијање функционалних олигосахарида.

Лигнуцелулозне сировине или сировине друге генерације у производњи биоетанола, предмет су научних истраживања већ неколико деценија за добијање алтернативних извора енергије, али се занемарује могућност њихове примене у производњи хране и функционалних додатака исхрани, где би требало да одиграју важну улогу. Основна

предност лигноцелулозних сировина у поређењу са сировинама на бази шећера и скроба, за које је потребно обезбедити одговарајуће услове пољопривредне производње, је што се најчешће ради о отпадним материјалима који се не користе директно за производњу хране. Међутим, основни ограничавајући фактор примене ових сировина је комплексност њихове прераде јер се ради о сложеним хемијским једињењима чија разградња обично захтева предтретман и примену скувих ензима, чиме се повећавају трошкови процеса производње.

Иако се ензими, нарочито целулолитички ензими, сматрају најефикаснијим у конверзији лигноцелулозе до олигосахарида, ретко се може користити само један ензим за разградњу ових сложених материјала, па се комбинацијом два и више ензима може доћи до оптималног система. Такође, потребно је рационално коришћење ензима због целокупне економичности процеса, па је избор ензима или ензимских коктела, као и оптимизација процесних параметара, од круцијалне важности. У већини биотехнолошких процеса који се примењују за разградњу целулозе, од комерцијалних целулолитичких ензима користе се целулазе из *Trichoderma reesei* познате под називом Novozyme Celluclast. *T.reesei* производи ендоглуканазе и егзоглуканазе у великим количинама, док је активност β -глукозидазе мала, због чега се користи у комбинацији са Novozyme 188 који садржи β -глукозидазу из плесни *Aspergillus niger*. Често се користе и Novozymes Cellic CTec2, који представља комбинацију целулаза, хемицелулаза и β -глукозидаза, као и Cellic HTec2, који садржи целулазе и ендоксилазае које разграђују хемицелулозу. Важну групу чине „помоћни“ ензими попут хемицелулаза, односно ксиланаза и мананаза, који током процеса хидролизе олакшавају целулазама приступ супстрату и делују синергистички вршећи хидролизу делигнификованог материјала и који ће бити предмет истраживања у овој дисертацији. У помоћне ензиме који делују синергистички и врше хидролизу ксилана и манана, спадају и ксилан естеразе, феруличне и р-кумаричне естеразе, α -4-О-метилглукуронозидазе и α -1-арабинофуранозидазе.

Како би ензимска хидролиза лигноцелулозних сировина била успешна, претходно је потребно извршити предтретман сировине. Предтретман може бити физички (механички предтретман-механичко уситњавање, предтретман зрачењем, пиролиза, ултразвук, екструзија), физичко-хемијски (експлозија под утицајем водене паре, експлозивна декомпозиција у присуству амонијака, експлозивна декомпозиција у присуству угљен-диоксида, предтретман топлотом водом), хемијски (киселински и алкални предтретман, предтретман органским растварачима, предтретман алкохолима, озонолиза, влажна оксидација, третман јонским течностима) или биолошки предтретман. Циљ предтретмана је повећање порозности сировине, уклањање лигнина и хемицелулозе, као и смањење кристаличности целулозе. Од велике је важности оптимизовати предтретман са аспекта одвијања наредног корака, ензимске хидролизе, нарочито у погледу смањења ослобађања једињења која могу деловати инхибиторно на ензиме лигноцелулозног комплекса.

Циљ истраживања ове докторске дисертације је биотехнолошка производња и одређивање потенцијала ксиланазе из *Thermomyces lanuginosus* за разлагање лигноцелулозног отпада из пољопривредне и прехранбене индустрије ради ослобађања олигосахарида одређене хемијске структуре и пребиотских својстава, односно, одређене

биолошке активности. Испитаће се и њихова компатибилност са осталим ензимима целулолитичког комплекса за разградњу биомасе. Пошто се лигноцелулозне сировине значајно разликују по пореклу, структури и хемијском саставу, ензимска хидролиза може имати различите ефекте чак и када се користе исти ензими и реакциони услови, па чак и различите шарже исте сировине. Због тога, истраживања у овом раду ће бити усмерена на пољопривредни и прехранбени отпад, пшеничну сламу, пшеничне мекиње и сојине љуспе које заостају након прераде соје. Поред тога, један од највећих изазова у овом раду је испитивање потенцијала ензимске хидролизе произведеном ксиланазом предобрађене лисне биомасе, која заостаје након издвајања протеинских фракција, за добијање функционалних олигосахарида. Овим би се уградила додатна вредност у виду добијених олигосахарида у постојећи ланац вредности производње протеина из лисне биомасе, што је у складу са принципима одрживог развоја и циркуларне економије.

Ефикасна конверзија лигноцелулозног отпада катализована ензимима, зависи од великог броја фактора, при чему је одабир ензима од кључне важности. Ензими, чак и из истих група и фамилија, се међусобно веома разликују по специфичности деловања на лигноцелулозу, тј. по афинитету разлагања ланца, али и по термостабилности и подложности деловања инхибитора, који су често и сами производи хидролизе. Обзиром да се врсте родова *Trichoderma* и *Aspergillus* најчешће користе за производњу комерцијалних целулолитичких ензима, у овом раду ће се испитати синергистички механизам хидролизе ксиланазе произведене из *Thermomyces lanuginosus* са овим ензимима, али ће се испитати и њено синергистичко дејство са другим целулазама и ензимима осталих група. Поред тога, важно је испитати и начин одвијања процеса као и динамику додавања ензима јер је познато да су продукти хидролизе хемицелулозе (ксилоза, ксилооологосахариди, галактоза и маноза) снажни инхибитори целулаза и β -глюкозидаза. Уопштено, разградња лигноцелулозног материјала ко-хидролизом два или смеше више ензима је сложен процес и њихова међусобна интеракција још увек није у потпуности разјашњена.

Поред овога, у раду ће се оптимизовати и услови микробиолошке производње ксиланазе из *T.lanuginosus* у погледу избора супстрата и параметара култивације. Ксиланазе су релативно скупи ензими, па је значајно смањење трошкова њихове производње кључно како би цена добијених олигосахарида постала конкурентна цени синтетичких пребиотика и других комерцијалних суплемената и додатака исхрани. Производња ових ензима из јефтиних супстрата, као и повећање њихове продуктивности и термичке стабилности, неопходни су како би се процес хидролизе учинио конкурентним за добијање функционалних додатака исхрани.

Појединачни циљеви у оквиру ове дисертације су:

- оптимизација производње ксиланазе из *Thermomyces lanuginosus* у погледу избора супстрата, начина култивације и параметара процеса;
- усвајање оптималне шеме пречишћавања добијених ксиланаз и њихова карактеризација;
- одређивање потенцијала произведених ксиланаз да разлажу пшеничну сламу, пшеничне мекиње, сојине љуспе и лисну биомасу уз синергетско дејство са

целулазама и одабраним помоћним ензимима у првој фази истраживања и карактеризација добијених олигосахарида;

- испитивање утицаја предтретмана одабраног супстрата на кинетику хидролизе лигноцелулозе са датом ксиланазом и одабраним целулолитичким и помоћним ензимима;
- одређивање пребиотског потенцијала и антиоксидативне активности произведених олигосахарида и њихова карактеризација.

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

[1] Anuradha P., Vijayalakshmi K., Prasanna N.D., Sridevi K., 2007, *Production and properties of alkaline xylanases from Bacillus sp. isolated from sugarcane fields*, Current Science, Volume 92, No. 9, pp. 1283-1286.

[2] Bajaj, B.K., Abbass, M., 2011, *Studies on an alkali-thermostable xylanase from Aspergillus fumigatus MA28*, 3 Biotech, Volume 1, No. 3, pp. 161-171.

[3] Bajaj B. K., Manhas K., 2012, *Production and characterization of xylanase from Bacillus licheniformis P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry*, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 1, pp. 330-337.

[4] Bajpai P., 1997, *Microbial Xylanolytic Enzyme System: Properties and Applications*, Advances in Applied Microbiology, Volume 43, pp. 141-194.

[5] Bastawde K.B., 1992, *Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Volume 8, No. 4, pp. 353-368.

[6] Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S., 2001, *Microbial xylanases and their industrial applications: a review*, Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 56, pp. 326-338.

[7] Biely P., 1991, *Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases*, ACS Symp. Ser. 460, pp. 408-416.

[8] Biely P., Vrsanska M., Tenkanen M., Kluepfel D., 1997, *Endo- β -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties*, J. Biotechnol, Volume 57, pp. 151-166.

[9] Bradford M.M., 1976, *A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, Volume 72, pp. 248-254.

[10] Burlacu A., Cornea C. P., Roming F. I., 2016, *Microbial xylanase: a review*, Scientific Bulletin Series F Biotechnologies, Volume XX, pp. 1285-1364.

[11] Bushra K., Mazhar Ali N., 2016, *Optimization of fermentation media and growth conditions for microbial xylanase production*, 3 Biotech, Volume 6, No. 2, pp. 122.

- [12] Bustos G., Moldes A.B., Cruz J.M., Domínguez J.M., 2004, *Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by Lactobacillus pentosus*, Journal of the Science of Food and Agriculture, Volume 84, Issue 15, pp. 2105-2112.
- [13] Cesar T., Mersa V., 1996, *Purification and properties of the xylanase produced by Thermomyces lanuginosus*, Enzyme and Microbial Technology, Volume 19, Issue 4, pp. 289-296.
- [14] Chandrakant P., Bisaria V.S., 2008, *Simultaneous Bioconversion of Cellulose and Hemicellulose to Ethanol*, Crit Rev Biotechnol, Volume 18, pp. 295-331.
- [15] Charney J., Tomarelli R. M., 1947, *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*, The Journal of Biological Chemistry, Volume 171, No. 2, pp. 501-505.
- [16] Collins T., Hoyoux A., Dutron A., Georis J., Genot B., Dauvrin T., 2006, *Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking*, Journal of Cereal Science, Volume 43, pp. 79-84.
- [17] Damaso M. C. T., Almeida M. S., Kurtenbach E., Martins O. B., Pareira N. J., Andrade C. M. M. C., Albano R. M., 2003, *Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from Thermomyces lanuginosus in Pichia pastoris*, Applied and Environmental Microbiology, Volume 69, Issue 10, pp. 6064-6072.
- [18] Dervilly G., Leclercq C., Zimmermann D., Roue C., Thibault J., Saulnier L., 2002, *Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt*, Carbohydr. Polym, Volume 47, pp. 143-149.
- [19] Deutschmann R., Dekker R.F., 2012, *From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research*, Biotechnol Advances, Volume 30, No. 6, pp. 1627-1640.
- [20] Dodd D., Cann I.K., 2009, *Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production*, Glob Change Biol Bioenergy, Volume 1, No. 1, pp. 2-17.
- [21] Edlund U., Albertsson A.C., 2008, *A Microspheric System: Hemicellulose-based Hydrogels*, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, Volume 23, Issue 2, pp. 171-186.
- [22] Esteban R., Villanueva I.R., Villa T.G., 1982, *β -D-Xylanases of Bacillus circulans WL-12*, Can. J. Microbiol, Volume 28, pp. 733-739.
- [23] Ghoshal G., Banerjee U. C., Shivhare U. S., 2015, *Utilization of agrowaste and xylanase production in solid state fermentation*, Journal of Biochemical Technology, Volume 6, Issue 3, pp. 1013-1024.
- [24] Gilbert H.J., Hazlewood G.P., 1993, *Bacterial cellulases and xylanases*, J Gen Microbiol, Volume 139, Issue 2, pp. 187-194.
- [25] Hromadkova Z., Kovacikova J., Ebringerova A., 1999, *Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan*, Industrial Crops and Products, Volume 9, pp. 101-109.

- [26] Kabel M.A., 2007, *Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose*, Carbohydrate Polymers, Volume 69, No. 1, pp. 94-105.
- [27] Kaur H., Dutt D., Tyagi C. H., 2011, *Production of novel alkali-tolerant cellulose-poor xylanases from Coprinopsis cinerea HK-1 NFCC1-2032*, BioResources, Volume 6, No. 2, pp. 1376-1391.
- [28] Khandeparkar R.D.S., Bhosle N.B., 2006, *Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by Arthrobacter sp. MTCC 5241 when grown in solid-state fermentation*, Enzyme Microbial Technology, Volume 39, pp. 732-742.
- [29] Kulkarni N., Shendye A., Rao M., 1999, *Molecular and biotechnological aspects of xylanases*, FEMS Microbiology Reviews, Volume 23, Issue 4, pp. 411-456.
- [30] La Grange D.C., Pretorius I.S., Claeyssens, M., Van Zyl W. H., 2001, *Degradation of xylan to D-xylose by recombinant Saccharomyces cerevisiae coexpressing the Aspergillus niger beta-xylosidase (xlnD) and the Trichoderma reesei xylanase II (xyn2) genes*, Applied and Environmental microbiology, Volume 67, Issue 12, pp. 5512-5519.
- [31] Madlala A., Bissoon S., Singh S., Christov L., 2001, *Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types*, Biotechnology Letters, Volume 23, pp. 345-351.
- [32] Mandal A., 2015, *Review on microbial xylanases and their applications*, International Journal of Life Sciences, Volume 4, No. 3, pp. 178-187.
- [33] Martins D.A.B., 2011, *Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production*, Integrated Waste Management-Volume II. M.S. Kumar, InTech: Shanghai, pp. 319-360.
- [34] Miller G.L., 1959, *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Analytical Chemistry, Volume 31, No. 3, pp. 426-428.
- [35] Mohana S., Shah A., Jyoti D. and Madamwar D., 2008, *Xylanase production by Burkholderia sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash*, Bioresource Technology, Volume 99, No. 16, pp. 7553-7564.
- [36] Oliveira E.E., 2010, *Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: production and characterization*, Bioresource Technology, Volume 101, No. 14, pp. 5402-5406.
- [37] Olsson L., Hahn-Hägerdal B., 1996, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*, Enzyme and Microbial Technology, Volume 18, pp. 312-331.
- [38] Onysko K., 1993, *Biological bleaching of chemical pulps: a review*, Biotechnology Advances, Volume 11, pp. 179-198.
- [39] Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J., 1998, *Biotechnological production of xylitol*, Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis, Bioresource Technology, Volume 65, pp. 191-201.

- [40] Paridon P.A., Boonman J.C.P., Selten G.C.M., Geerse C., Barug D., de Bot P.H.M., Hemke G., 1992, *The application of fungal endoxylanase in poultry diets*, in: Visser J., Beldman G., Kusters-van Someren M.A., Voragen A.G.J., (Eds.), *Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam.
- [41] Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., 2005, *Xylanases from fungi: properties and industrial applications*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 67, No. 5, pp. 577-591.
- [42] Qinnghe C., Xiaoyu Y., Tiangui N., Cheng J., Qiugang M., 2004, *The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus Pleurotus ostreatus*, *Process Biochemistry*, Volume 39, pp. 1561-1566.
- [43] Roberfroid M.B., 1997, *Health benefits of non-digestible oligosaccharides*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 427, pp. 211-219.
- [44] Semenčenko V.V., 2013, *Ispitivanje različitih hibrida kukuruza kao sirovine za proizvodnju bioetanol, skroba i hrane za životinje*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 93, No, 4, pp.811-818.
- [45] da Silva R., Lago E.S., Merheb C.W., Macchione M.M., Park Y.K., Gomes E., 2005, *Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by Thermoascus aurantiacus miehe*, *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 36, No. 3, pp. 235-241.
- [46] Subramaniyan S., Prema P., 2000, *Cellulase-free xylanases from Bacillus and other microorganisms*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 183, pp. 1-7.
- [47] Subramaniyan S., Prema P., 2002, *Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application*, *Critical Reviews in Biotechnology*, Volume 22, pp. 33-64.
- [48] Sunna A., Antranikian G., 1997, *Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria*, *Critical Reviews in Biotechnology*, Volume 17, pp. 39-67.
- [49] Vázquez M., Alonso J., Domínguez H., Parajó J., 2000, *Xylooligosaccharides: manufacture and applications*, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 11, pp. 387-393.
- [50] Viikari L., Ranua M., Kantelinen A., Sundquist J., Linko M., 1986, *Biotechnology in the pulp and paper industry*, in: *Bleaching with Enzymes. Proc. 3rd Int. Con. Stockholm*.
- [51] Viikari L., Vehmaanperä J., Koivula A., 2012, *Lignocellulosic ethanol: From science to industry*, *Biomass and Bioenergy*, pp. 1-12.
- [52] Voragen A.G.J., 1998, *Technological aspects of functional carbohydrates*, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 9, pp. 328-335.

3. Полазне хипотезе

На основу досадашњих испитивања познатих у научној литератури, предложена истраживања у оквиру ове докторске дисертације полазе са основног становишта да се лигноцелулозне сировине, осим у производњи алтернативних извора енергије, могу користити и у производњи хране и функционалних додатака исхрани, при чему основни ограничавајући фактор у њиховој примени представља комплексност хемијске структуре и захтев за предтретманом и применом ензима за њихову ефикасну разградњу. Истраживања у овој дисертацији полазе од следећих хипотеза:

- у конверзији лигноцелулозе до олигосахарида користи се више различитих ензима при чему важну улогу имају „помоћни“ ензими у које спадају ксиланазе;
- субмерзним поступком гајења на карактеристичном медијуму од бујона, у присуству одговарајућег супстрата, помоћу гљиве *Thermomyces lanuginosus* могућа је производња ксиланаза велике ензимске активности;
- добијене ксиланазе имају капацитет да разлажу пшеничну сламу, пшеничне мекиње и сојине љуспе уз синергетско дејство са целулазама и одабраним помоћним ензимима, при чему настају олигосахариди;
- добијене ксиланазе показују потеницијал за ензимску разградњу лисне биомасе која заостаје након издвајања протеинских фракција и добијање функционалних олигосахарида;
- одговарајући предтретман одабраног супстрата може имати утицај на кинетику хидролизе лигноцелулозе са произведеном ксиланазом и одабраним целулолитичким и помоћним ензимима;
- добијени олигосахариди показују пребиотски и антиоксидативни потенцијал, при чему постају конкуретни синтетским пребиотицима и другим комерцијалним суплементима и додацима исхрани.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације базираће се на претходно наведеним хипотезама и сходно томе претпоставља се да ће се из *T.lanuginosus* произвести ксиланазе које поседују добар потенцијал за разградњу биљног отпада, при чему настају олигосахариди који би требало да показују добар пребиотски потенцијал и високу антиоксидативну активност.

4. Научне методе истраживања

У поступку реализације научно-истраживачких циљева у оквиру ове докторске дисертације, истраживања ће бити започета припремањем суспензије спора *Thermomyces lanuginosus* на косом агару, након чега ће микроорганизам бити подвргнут субмерзној ферментацији (SMF) у модификованом медијуму бујона од изабраних супстрата као извора угљеника и са додатком индуктора и других једињења у току 10 дана на тресилици (IKA® KS 4000i control, Staufen, Nemačka) у контролисаним условима. Микроорганизам који ће бити коришћен у овом испитивању потиче из колекције микроорганизма лабораторије за микробиологију ТМФ-а, Универзитета у Београду. Сваког дана ферментације узимаће се сирови екстракт ензима, филтрирати и центрифугирати (Hermle Z 206 A, Hermle Labortechnik GmbH, Nemačka) у контролисаним условима. Активност ксиланаза биће мерена спектрофотометријски (Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience, Corston, Velika

Britanija) према ДНС (3,5-динитросалицилна киселина) тесту за одређивање редукованих шећера. Екстракт ензима који буде показао највећу активност, користиће се за одређивање температурног и рН оптимума, температурне и рН стабилности, као и кинетичких параметара произведених ксиланаза. Квантитативно одређивање садржаја протеина вршиће се стандардном методом по Лорију, користећи говеђи серум албумин (BSA) као референтни стандард.

Како су ксиланазе екстрацелуларни ензими, утврђивање шеме пречишћавања профилираног и центрифугираног раствора ензима, почеће концентровањем (ултрафилтрација, таложење исољавањем), а наставиће се применом хроматографских метода у циљу постизања већег степена чистоће ензимског препарата. Веома је важно да у току изоловања не дође до разградње ензима истовремено синтетисаним протеазама или денатурације ензима топлотом, органским растварачима или другим хемикалијама, које би довеле до губитка њихове каталитичке активности. Примениће се препаративна јоноизмењивачка, гел-филтрациона, хидрофобна и реверзно-фазна хроматографија, а чистоћа и молекулска маса ензимских препарата утврдиће се електрофоретским техникама, пермеационом хроматографијом под високим притиском, HPSEC метода као и фракционим ултрацентрифуговањем (Optima XPN-100, Beckman Coulter Life Science).

У циљу што ефикасније хидролизе лигноцелулозних сировина, испитаће се утицај различитих предtretмана сировине на кинетику хидролизе целулозе и хемицелулозе (механички предtretман уситњавањем, експлозија под утицајем водене паре, киселински и алкални хемијски предtretман, улразвучни предtretман). Хидролиза ће се обављати у лабораторијским условима у воденом купатилу при дефинисаним условима температуре, рН, интензитета мешања и количине ензима, а степен хидролизе ће се мерити одређивањем концентрације редукованих шећера спектрофотометријски према ДНС тесту.

На крају ће се вршити детаљна карактеризација смеше добијених олигосахарида. Одређивање њиховог пребиотског потенцијала испитиваће се коришћењем бактерија из рода *Lactobacillus*, чији се раст и активност поспешује у присуству пребиотика. Бактерије које ће се користити потичу из колекције микроорганизама лабораторије за микробиологију ТМФ-а, Универзитета у Београду. Антиоксидативна активност биће одређивана спектрофотометријским методама и то мерењем способности добијених олигосахарида да редукују радикалски катјон ABTS^{•+} (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)) и хелирају јоне метала (јоне гвожђа). Добијене смеше олигосахарида раздвајаће се на фракције применом мембранских сепарационих техника и испитивати на антиоксидативну и пребиотску активност. Фракције које буду имале највећу биолошку активност карактерисаће се техникама и пермеационом хроматографијом под високим притиском (HPSEC метода) у погледу расподеле молекулских маса и степена полимеризације олигосахарида. Анализе ће се вршити на хроматографском систему са DAD и RID детектором (Shimadzu RID-20A) на Zorbax Eclipse PSM-300 колони које су снабдевене одговарајућим претколонама ради безбедности рада, али и на другим колонама и применом реверзно-фазне хроматографије високих перформанси (RC-HPLC).

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће добијени резултати у истраживањима у оквиру ове докторске дисертације допринети сагледавању утицаја састава хранљиве подлоге и параметара ферментације на производњу ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus*, користећи јефтине супstrate, при чему би произведене ксиланазе показале висок степен активности, стабилности и продуктивности и могућност употребе у условима који одговарају различитим индустријама. На тај начин би се постигла већа економичност индустрија које користе ове ензиме јер би се смањила цена њихове производње. Такође, очекују се позитивни резултати у коришћењу произведених ензима у хидролизи лигноцелулозних сировина и лисне биомасе са циљем ослобађања олигосахарида који би требало да показују добар пребиотски потенцијал и високу антиоксидативну активност. На тај начин би се лигноцелулозне сировине, осим за производњу алтернативних извора енергије, могле користити и као јефтина сировина у производњи хране и функционалних додатака исхрани. Поред овога, очекује се да ће се хидролизом лисне биомасе, која заостаје након издавања протеинских фракција, додати нова вредност у виду добијених олигосахарида у постојећи ланац вредности производње протеина из лисне биомасе, што је у складу са принципима одрживог развоја и циркуларне економије.

Сходно свему наведеном, научни допринос ове докторске дисертације се огледа у следећем:

- утврђивање оптималних услова, одговарајућег супстрата, параметара процеса и начина производње ксиланаза из *T.lanuginosus*;
- утврђивање оптималне шеме пречишћавања произведених ксиланаза;
- утврђивање капацитета добијених ксиланаза за разлагање пшеничне сламе, пшеничних мекиња, сојиних љуспи и лисне биомасе;
- утврђивање синергетског дејства добијених ксиланаза са целулазама и одабраним помоћним ензимима за разградњу биљног отпада;
- утврђивање шеме предтретмана одабраног супстрата и кинетике хидролизе са произведеним ксиланазама и одабраним целулолитичким и помоћним ензимима;
- утврђивање функционалних својстава олигосахарида, њиховог пребиотског потенцијала и антиоксидативне активности.

6. План истраживања и структура рада

Предмет научног истраживања у оквиру ове докторске дисертације односиће се на производњу ксиланаза која се добија из гљиве *Thermomyces lanuginosus* и њен потенцијал за разградњу биљног отпада и добијање функционалних олигосахарида који имају пребиотски потенцијал и антиоксидативну активност.

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

У поглављу *Увод* биће дефинисан предмет и значај истраживања докторске дисертације и биће дат осврт на актуелну проблематику, допринос и главне циљеве.

У поглављу *Теоријски део* биће дат преглед доступних литературних података у оквиру истраживања на тему производње и примене ксиланаза, употребе лигноцелулозних сировина, као и њихове хидролизе. Такође, размотриће се хидролиза лисне биомасе, употребе одговарајућих ензима за хидролизу и добијање олигосахарида, као и карактеристике олигосахарида и њихова употреба. Такође, биће дат осврт и на могућности предтретмана лигноцелулозних сировина у циљу постизања ефикасније ензимске хидролизе.

У поглављу *Експериментални део* биће дат опис:

- материјала коришћених током истраживања у оквиру израде докторске дисертације;
- опреме коришћене за експериментална истраживања;
- метода и примењених техника за извођење експеримената;
- култивације микроорганизама;
- производње ксиланаза техником субмерзног гајења у течним храњивим подлогама;
- оптимизације процеса производње ксиланаза у погледу избора супстрата, начина култивације и параметара процеса;
- поступка пречишћавања добијених ксиланаза;
- предтретмана одабраног супстрата;
- хидролизе лигноцелулозних сировина и лисне биомасе добијеним ксиланазама уз синергетско дејство са одабраним целулолитичким и помоћним ензимима;
- одређивања пребиотског потенцијала и антиоксидативне активности, као и карактеризације добијених олигосахарида.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће приказани и дискутовани експериментално добијени резултати. Резултати који се односе на производњу ксиланаза из *T.lanuginosus* и одређивање активности добијеног ензима, показује који дан ферментације даје екстракт ензима који показује највећу активност, а резултати који се односе на оптимизацију процеса производње ензима даће приказ најоптималнијих услова производње ксиланаза са аспекта продукованих ензимских јединица. Биће приказано како предтретман лигноцелулозних сировина утиче на њихову хидролизу, као и компатибилност добијених ксиланаза са осталим ензимима целулолитичког комплекса у разградњи биљног отпада. На крају, биће анализирани и дискутовани резултати пребиотског потенцијала и антиоксидативне активности добијених олигосахарида. Од великог значаја је утврдити корелацију између пребиотске, антиоксидативне активности и хемијске структуре (степен полимеризације) добијених олигосахарида. Сви добијени резултати биће поређени са релевантним подацима доступним у научној литератури и у складу са тим донеће се закључци о потенцијалној примени ксиланаза из *T.lanuginosus* за разградњу биљног отпада и добијање функционалних олигосахарида.

У поглављу *Закључак* сумарно ће бити приказани резултати истраживања уз ивођење закључка о примени и значају ксиланаза из *T.lanuginosus* за разградњу биљног отпада и добијање функционалних олигосахарида.

У поглављу *Литература* биће дат приказ цитираних научних радова и књига, коришћених у изради докторске дисертације, укључујући и научне радове проистекле из есперименталних истраживања у оквиру израде ове докторске дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу изложеног, Комисија сматра да је тема предложене докторске дисертације кандидата **Јелене Бакрач** под називом „**Производња и потенцијал ксиланазе из *Thermomyces lanuginosus* за разградњу биљног отпада и добијање функционалних олигосахарида**“ 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 предвиђених циљева истраживања докторске дисертације. Такође, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета да упути захтев Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду за давање сагласности на предлог теме докторске дисертације. Истраживања предвиђена овом докторском дисертацијом 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 Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 21.12.2022. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

Др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Маја Вукашиновић-Секулић, ванредни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Јелена Мијалковић, научни сарадник
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Валентина Николић, виши научни сарадник
Институт за кукуруз „Земун поље“ у Београду
