

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата **Abdalla Ali Salim**, мастер инжењера технологије.

Одлуком број **35/39** од **31.01.2019. године**, именовани смо за чланове комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Abdalla Ali Salim**, под насловом

„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus*“

„Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.“

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са кандидатом, Комисија је сачинила следећи

РЕФЕРАТ

1. УВОД

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

Кандидат **Abdalla Ali Salim**, маст. инж. технол., је школске 2014/2015. године уписао докторске академске студије на Универзитету у Београду, Технолошко-металуршком факултету, профил Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Ректор Универзитета у Београду донео је **Решење број 06-61301-5990/3-13** од 20.12.2013. године о признавању високошколске исправе стечене на Универзитету у Мисурати, Либија, из 2009. године, чиме је стекао право на наставак образовања на Универзитету у Београду, Технолошко-металуршком факултету.

24.01.2019. године – Кандидат **Abdalla Ali Salim**, маст. инж. технол., предложио је тему докторске дисертације под називом: **„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus*“** („Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.“), а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости теме 31.01.2019. године.

11.04.2019. године – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, на основу поднетог реферата комисије, донета је одлука (бр. одлуке 35/39) о прихватању предлога теме докторске дисертације **Abdalla Ali Salim**, маст. инж. технол., под називом **„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus*“** („Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.“), а

за ментора ове дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета.

22.04.2019. године – На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације **Abdalla Ali Salim**, маг. инж. технол., под називом **„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus*“** („**Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.**“).

30.01.2020. године – На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука о именовању комисије за оцену и одбрану докторске дисертације **Abdalla Ali Salim**, маг. инж. технол., под називом **„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus*“** („**Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.**“) (бр. одлуке 35/39).

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове дисертације припадају научној области Технолошко-инжењерство (*ужа научна област Биотехнологија и биохемијско инжењерство*) за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За ментора је изабрана др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, која је на основу објављених публикација и искуства компетентна да руководи изградом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Abdalla Ali Salim, маг. инж. технол., рођен је 12.04.1985. године у Мисрати у Либији, где је завршио основну и средњу школу. Студије на Универзитету Мисрата (Science Faculty) завршио је школске 2009. године. Мастер академске студије, на Технолошко-металуршком факултету, на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију завршио је 2014. године одбравивши мастер рад под називом: *“Утицај врсте претретмана на хидролизу протеина беланцета катализовану протеазом из *Bacillus licheniformis* – кинетика процеса и математичко моделовање“*. Докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписао је школске 2014/2015. године на одсеку за Биохемијско инжењерство и биотехнологију. Положио је све испите предвиђене наставним планом докторских студија са просечном оценом 9,64. Говори арапски и енглески језик. Завршио је неколико Microsoft Windows курсева. Као коаутор објавио је један рад у међународном часопису изузетних вредности (M21_a) и један рад у међународном часопису (M23), једно саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33) и једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација **Abdalla Ali Salim**, маг. инж. технол., написана је на енглеском језику на 157 страна, садржи 39 слика, 8 једначина, 14 табела и 170 литературних навода. Докторска дисертација састоји се из следећих поглавља: *Увод*,

Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључци и Литература, уз изводе на српском и енглеском језику. На почетку дисертације дат је Резиме на енглеском и српском језику, а на крају дисертације налази се Биографија на српском и енглеском језику и три обавезна Прилога: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије рада и Изјава о коришћењу.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У *Уводу* дат је кратак опис проблематике генерисања и искоришћења агроиндустријског отпада на глобалном нивоу. Нарочито је стављен акценат на негативан утицај агроиндустријског отпада на човека и животну средину уколико се неправилно складишти. Истакнут је значај примене различитих биотехнолошких поступака у циљу валоризације агроиндустријског отпада, нарочито ферментационих процеса на чврстим и течним хранљивим подлогама, у циљу производње вредних микробиолошких метаболита. Наглашено је да се ова врста лигноцелулозних материја може користити као одличан супстрат у ферментационим процесима, при чему се захваљујући метаболичкој активности микроорганизама, може повећати нутритивна вредност супстрата, али и произвести велики број различитих ензима и других производа. Кључни фактори који утичу на ефикасност и економску изводљивост процеса су развој ефикасних претретмана и проналажење микроорганизама који су способни да расту на лигноцелулозним супстратима и производе ензиме од значаја. У *Уводу* је дефинисан и предмет истраживања као и главни циљеви дисертације.

Теоријски део се може поделити у два потпоглавља и то: 1) Ферментација на чврстој подлози; и 2) Нутритивна и антинутритивна вредност ферментисаног агроиндустријског отпада.

У оквиру потпоглавља *Ферментација на чврстој подлози* јасно су дефинисани и објашњени основни појмови од значаја за ову тему као и начини извођења и параметри процеса. Ферментација на чврстој подлози (на енгл. *solid-state fermentation*) је техника гајења микроорганизама која се одиграва у одсуству или уз минимално присуство слободне воде између честица хранљиве подлоге. То је систем који подразумева раст микроорганизама на чврстом супстрату чији капацитет за задржавање течности зависи од саме врсте материјала. Техника гајења на чврстој подлози датира из давних времена, када су се чврсте подлоге користиле као извор нутријената за гајење микроорганизама, пре свега плесни и гљива, које за свој раст и развој и захтевају средину са ниским садржајем воде, што уједно представља и параметар којим је могуће контролисати метаболизам и секрецију микроорганизама. Главна разлика између ферментације у течной и чврстој хранљивој подлози је у томе што је при субмерзном гајењу смеша микроорганизама, нутријената и метаболита хомогена и униформно распоређена у биореактору, чиме је дифузија између метаболита и гасова олакшана. Ферментација на чврстој подлози је хетероген систем у погледу микробне популације и концентрације раствора. Ствара се градијент концентрације нутријената и кисеоника као и градијент температуре. Зато се препоручује мешање, интензивна аерација за уклањање угљен-диоксида и топлоте и равномерно кондиционирање. Ова техника гајења у великом броју студија показала је и одређене предности у поређењу са техником гајења у течной подлози. Као основна предност ове технике истиче се смањење катаболичке репресије микроорганизама вишком супстрата и могућност примене различитих чврстих супстрата, често отпадних материјала, као подлога за гајење. Праћењем различитих параметара у току ферментације и испитивањем њиховог утицаја на принос циљаног производа утврђено је да највећи значај имају следећи процесни параметри: хемијски састав и физички облик супстрата, физичко/хемијски претретман супстрата и параметри при претретирању, садржај влаге, густина инокулума, суплементација

медијума за раст, температура, рН, садржај кисеоника, брзина и начин мешања, одвођење угљен-диоксида и сепарација биомасе, а као најзначајнији параметри којима се мора посебно посветити пажња су величина честица чврстог супстрата и садржај воде у систему. Постоје бројни супстрати, споредни производи агроиндустрије, који се могу искористити као подлога за раст микроорганизама и они су описани у даљем тексту.

Сојина сачма је споредни производ прераде соје, који настаје након уклањања уљане фракције из зрна соје, а одликује се високим садржајем протеина 40-53%, што је од есенцијалног значаја за њихову примену у исхрани животиња. Поред високог садржаја протеина, изузетан профил аминокиселина (висок садржај лизина, триптофана, треонина и изолеуцина, али и низак садржај метионина и цистеина), који је чини веома сварљивом, је друга карактеристика сојине сачме због чега је она незаменљив додаток хранивима за животиње. Приликом обраде сојиног зрна и екстракције уља, процес се углавном води на високим температурама због потребе за уклањањем антинутритивних компонента које постоје у сојином зрну. Овакав третман може значајно да промени, пре свега наруши аминокиселински састав, што директно утиче на сварљивост и ограничава примену сојине сачме као додатка исхрани животиња. Поред сојине сачме, сунцокретова сачма се такође сматра погодним супстратом за гајење микроорганизама на основу хемијског састава: протеини ~35%, целулоза ~25% и лигнин ~10%. У поређењу са сојиним сачмом сунцокретова сачма има знатно мањи садржај лизина, али значајно је богатија метионином и влакнима и не садржи антинутритивне факторе. Пшеничне мекиње су такође изузетан супстрат за гајење микроорганизама јер се састоји од полисахарида ~35%, скроба ~15%, протеина 15% и лигнина 5%. Од полисахарида су најзаступљенији арабиноксилани ~70%, целулоза ~19% и ~6% глукани. Висок проценат нерастворних полисахарида чини пшеничне мекиње непогодним додатком сточној храни, али су одлична подлога за микробиолошку производњу ензима, аминокиселина, органских киселина и других једињења која имају велику примену у индустрији.

Техника гајења на чврстој подлози се веома успешно примењује у области добијања и производње органских киселина, различитих арома, а посебно се истиче могућност добијања различитих индустријски значајних хидролитичких ензима, што је детаљно представљено у оквиру потпоглавља *Примена гајења на чврстој подлози*.

Производња ензима на чврстој подлози има веома дугу традицију, а данас постоји велики комерцијални значај и потреба за производњом ензима као што су липазе, пектиназе, целулазе, протеазе и амилазе овом техником, нарочито уколико се добијени ензими могу директно примењивати без потребе за накнадним издвајањем и пречишћавањем. У наведеном делу докторске дисертације дат је приказ значајних хидролитичких ензима, њихова структура као и механизми деловања. Пектиназе су значајна група индустријских ензима који имају велику примену у индустрији сокова, приликом екстракције сока из воћа, затим у индустрији вина, кафе и чаја, али се веома често додају и у храну за преживаре јер се њиховим додатком смањује вискозност хране и повећава апсорпција нутријената. Посебно су описане целулазе, хетерогена група ензима која катализује хидролизу 1,4- β -D-гликозидних веза у целулози и обухвата различите ензиме који се разликују по структури, специфичности и механизму деловања. Ту спадају целулазе у ужем смислу речи (ендо 1,4- β -D-гlukan глуканохидролазе, ЕС 3.2.1.4), егзогlukanазе (егзо 1,4- β -D-гlukan целобиохидролазе, ЕС 3.2.1.91), β -глюкозидазе или целобиазе (β -D-глюкозид глюкохидролазе, ЕС 3.2.1.21) и други. Целулазе играју велику улогу у прехранбеној индустрији. Представљају важан део ензимског комплекса за мацерацију који се састоји од целулазе, пектиназе и хемичелулазе. Овај комплекс користи се за екстракцију и бистрење сокова од воћа и

поврћа, повећавајући приносе и смањујући време процеса, побољшавајући текстуру и смањујући вискозитет пулпе. Ензимска сахарификација лигноцелулозних материјала целулазама за производњу биогорива тренутно је једна од веома актуелних области истраживања. У наставку текста у дисертацији детаљно су описане амилазе (ЕС 3.2.1.2), које катализују парцијалну хидролизу скроба до глукозе или олигосахарида, приказана је класификација и специфичност ове групе ензима као и области примене. Исто тако, предмет ове докторске дисертације су и протеазе (Е.С. 3.4.), које катализују хидролизу пептидне везе у протеинима или у молекулима пептида, па су у оквиру овог поглавља описани основни механизми деловања ових ензима на пептидну везу, описана је структура неколико бактеријских и фунгалних протеаза и дата је њихова подела на основу структуре активног центра и начина деловања на пептидну везу. Детаљно су приказане главне специфичности група протеаза које чине: серинске, аспартатне, цистеинске и метало-протеазе које се детектују на основу понашања према специфичним инхибиторима. Протеазе су ензими чија је функција дигестија протеина, али поред тога оне имају веома важну улогу у метаболичким процесима као што су посттранслационе модификације других протеина, активација зимогенних форми ензима и учествују у комплексним метаболичким процесима. Правилним одабиром јефтиних сировина за раст микроорганизама, као и додатком одређених индуктора, могуће је усмерити метаболизам производног микроорганизама у правцу добијања ових високовредних индустријских ензима у високом приносу уз испуњавање свих критеријума еколошке прихватљивости оваквог процеса.

Агроиндустријски отпад представља комплексну подлогу за гајење микроорганизама у којој се налази све оно што је потребно микро организму за раст, међутим, веома често поједине компоненте нису лако доступне и остају неискоришћене, па је из тог разлога веома важно повећати доступност појединих фракција од стране микроорганизама. Повећање доступности се, пре свега, односи на фракционисање лигноцелулозних материјала на лигнин и угљене хидрате што се постиже увођењем претретмана сировине у технолошку шему процеса, који доводи до уклањања лигнина и разарање комплексне структуре биомасе, резултујући повећањем приноса ензима. Приказане су различите методе претретмана од физичких (млевење, екструзија), преко хемијских (киселине, базе, екстракција растварачима) до физичко-хемијских (ултразвук, микроталаса), а посебан акценат је постављен на примену технологије ултразвука и микроталаса, које привлаче велику пажњу истраживача због удружених физичко-хемијских ефеката које испољавају и преводе комплексне лигноцелулозне сировине у лако доступне супstrate које микроорганизми знатно лакше метаболишу. Поред избора супстрата и технике претретмана, од есенцијалног значаја је и избор микроорганизама који морају да задовоље критеријуме као што су висока продуктивност ензима жељених својстава, способност да расту брзо на јефтиним и доступним материјалима, али и да испуне одговарајуће безбедносне захтеве, тј. да нису патогени, да нису токсични, да немају никакву антибиотску активност и да имају тзв. „GRAS статус“ (на енгл. *generally recognized as safe*), уколико им је примарна област примене прехранбена индустрија.

У потпоглављу *Нутритивна и антинутритивна вредност агро-индустријског отпада* приказана је класификација и детаљно су објашњене све нутритивне и антинутритивне компоненте агроиндустријског отпада, који су се користили у овој докторској тези. Агроиндустријски отпад је хетерогене структуре која је нутритивно и антинутритивно веома комплексна. У агроиндустријском отпаду поред нутритивно вредних протеина, постоје компоненте које директно утичу на њихову дигестију. Наиме, *инхибитори протеаза* су главна антинутритивна компонента у агроиндустријским сировинама као што је, на пример, сојина сачма. У сојиној сачми

постоји неколико типова инхибитора протеаза као што су инхибитори трипсина. До сада је разјашњена и приказана структура два главна инхибитора протеаза у зрну соје и то Бовман-Бирков (на енгл. *Bowman-Birk inhibitor*) и Кунитз-ов инхибитор (на енгл. *Kunitz trypsin inhibitor*), који припадају групи серинских протеаза. Ова два инхибитора се значајно разликују у молекулској маси, а самим тим и структури и механизму деловања. Сматра се да се могу инактивирати термичким третманом сировине, међутим, термичким третманом се значајно нарушава профил сварљивости сировине, па су ово превазиђене технике, које се све више потискују ензимским претретманима. Поред инхибитора протеаза, агроиндустријски отпад је богат фитинском киселином. Фитинска киселина је један од елемената присутних у зрну житарица, лешницима, поврћу и биљним уљима и понаша се као нутритивни и антинутритивни фактор. Наиме, нутритивна вредност фитинске киселине се огледа у њеном антиоксидативном потенцијалу. Са друге стране, када су у питању лигноцелулозне сировине као што су, на пример, пшеничне мекиње, антинутритивни профил фитинске киселине је нарочито наглашен. Велики афинитет фитинске киселине ка двовалентним и тровалентним катјонима попут Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} и Ca^{2+} доводи до формирања комплексних једињења која нису сварљива. Исто тако, фитинска киселина гради нерастворне комплексе са протеинима, који директно утичу на њихова функционална својства као што су: вискозност, гелирајућа моћ, капацитет емулговања, капацитет формирања пене као и растворљивост у воденим срединама. Поред инхибитора протеаза и фитинске киселине, веома важна компонента агроиндустријских сировина су свакако и угљени хидрати ~33%, од чега су ~17% растворни. У сојином зрну су заступљени и растворни олигосахариди и нерастворни полисахариди. Од растворних највећи удео чине дисахарид сахароза, трисахарид рафиноза и третрасахариди стахиоза и вербаскоза. Осим сахарозе, ови олигосахариди сматрају се антинутритивним и тежи се њиховом уклањању. Поред антинутритивних елемената потребно је истаћи и то да у сировинама постоје и фенолна једињења за која је доказано да поседују низ фармаколошких и биохемијских својстава. Сходно томе, приказана је структура и класификација значајних фенолних једињења од оних најпростијих као што су фенолне киселине, до оних кондензованих са високим степеном полимеризације, као што су танини. Антинутритивни и нутритивни профил је могуће ублажити или побољшати пажљивим одабиром производног микроорганизама и услова ферментације. Нетермички, термички третман и микробна ферментација као методе уклањања антинутритивних фактора су детаљно објашњене и истакнуте су главне предности и недостаци ових поступака.

У поглављу *Материјали и методе* наведени су материјали и опрема који су коришћени у току израде ове докторске дисертације, а затим су таксативно наведене методе коришћене у току експерименталног рада и обраде резултата. Прво су описане методе гајања микроорганизама на различитим селективним подлогама помоћу којих је извршена селекција микроорганизама продуцента за производњу одређених ензима. Након одабира микроорганизама, извршена је поуздана идентификација изолата на основу стандардних биохемијских и морфолошких карактеристика, као и на основу савремених гентичких техника на основу секвенционирања 16S rDNA. Даље, у потпуности је описан начин на који је изођена ферментација на чврстој подлози уз детаљан приказ корака оптимизације процесних параметара као што су садржај воде и начин извођења претретмана чврстог агроиндустријског отпада. Затим су описане процедуре екстракције ензима из проферментисане подлоге са посебним освртом на: 1) конвенционалне технике које су извођене шаржно уз мешање; и 2) ултразвучно потпомогнуте екстракције ензима коришћењем ултразвучне сонде за генерисање ултразвука високог интензитета. Утицај различитих техника екстракције и принос

ензима праћени су коришћењем специфичних метода за утврђивање активности хидролитичких ензима: амилаза, протеаза, целулаза и пектиназа које су детаљно описане. Такође, приказане су методе екстракције и одређивање садржаја антинутритивних компонената као што су феноли, фитинска киселина и трипсин инхибитори. Како је један од основних циљева ове докторске дисертације повећање биолошког капацитета агроиндустријског отпада, од изузетне важности било је и праћење биолошких активности „*in vitro*“ методама. Стога, у овом поглављу описани су поступци за одређивање антиоксидативне активности издвојеног проферментисаног медијума и то: 1) способност неутрализације 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала (DPPH); и 2) способност неутрализације радикалског катјона 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS).

Поглавље *Резултати и дискусија* представља обједињене резултате добијене у експерименталном раду при изради ове дисертације, анализу и дискусију резултата, које укључују поређење са резултатима добијеним у радовима из литературе у различитим системима. У овом поглављу налази се три потпоглавља и то: 1) Производња ензима ферментацијом на агроиндустријским сировинама- евалуација утицаја претретмана; 2) Производња ензима на сојиној сачми техником ферментације на чврстој подлози- компаративна студија конвенционалних и ултразвучно потпомогнутих метода екстракције; и 3) Унапређење биолошког и антинутритивног профила сојине сачме након ферментације сојем *B. subtilis*.

У првом потпоглављу *Производња ензима ферментацијом на агроиндустријском отпаду- евалуација утицаја претретмана* дати су уводни резултати који се односе на селекцију радног микроорганизама, врсте супстрата, али и врсте претретмана којим је могуће постићи циљеве као што су висок принос ензима у погледу активности и побољшање нутритивног профила проферментисане подлоге. Испитана је способност великог броја различитих комерцијалних сојева и природних изолата из различитих станишта, који су део колекције ТМФ-а, да продукују поменуте хидролазе попут *Bacillus subtilis*, *B. toyonensis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *P. aeruginosa* ATCC, *B. mojavensis*, *P. aeruginosa* san-ai, *Candida rugosa*, *C. utilis*, *Yarrowia lipolytica*, при чему је селекција обухватила неколико фаза испитивања на селективним подлогама и на реалним супстратима. Након одабира неколико микробних сојева, који показују потенцијал продукције тражених хидролитичких ензима, један природан изолат означен као *Bacillus* ТМФ-1 је показао нарочито велики потенцијал на свим тестираним селективним подлогама са казеином, карбоксиметилцелулозом, пектином и скробом. Сходно чињеници да је овај сој природног порекла, извршена је идентификација секвенционирањем гена за кодирање 16SrRNA и накнадном анализом добијене секвенце коришћењем основног алата за претраживање логичког поравнања (на енгл. *Basic Logical Alignment Search Tool*, BLAST).

У даљем раду испитана је способност раста изабраног соја на различитим агроиндустријским сировинама попут кукурузних мекиња и плевне, пшеничних мекиња, уљане погаче након екстракције маслиновог уља, сојине сачме и других остатака након прераде соје, сунцокретове сачме и друго, као и способност соја да синтетички хидролитичке ензиме на овим супстратима. Сојина и сунцокретова сачма су се показале као најпогоднија подлога за одабрани микроорганизам у погледу производње целулаза и пектиназа, док су погача заостала након цеђења маслиновог уља и кукурузна плева изузетно погодни за производњу α -амилаза и протеаза. Оптимизацијом садржаја воде за гајење *Bacillus sp.* ТМФ-1 на различитој агроиндустријској сировини, принос жељених ензима је значајно повећан. Повећан садржај воде у сојиној сачми је био окидач за усмеравање метаболизма бактерије према биосинтези α -амилаза ($12,31 \text{ IU g}^{-1}$) и целулаза ($0,91 \text{ IU g}^{-1}$). Исти тренд повећања биосинтезе ензима забележен је и

приликом гајења соја на сунцокретовој сачми, уљаној погачи и пшеничним мекињама са повећаним садржјем воде, при чему су забележене активности α -амилаза, целулаза и пектиназа износиле редом 20,48 IU g⁻¹, 1,98 IU g⁻¹ и 22,55 IU g⁻¹. Нижи садржај воде у сојиној сачми је био погодан за биосинтезу и секрецију протеаза (14,63 IU g⁻¹), док је погача заостала након цеђења маслиновог уља при овим условима била погодна за производњу целулаза (0,56 IU g⁻¹). Поред садржаја воде, утврђено је да је правилан одабир претретмана супстрата од круцијалног значаја јер се на овај начин мењају структуре комплексних једињења у подлози као и физички облик супстрата, што се огледа и потврђује повећањем продуктивности микроорганизама и приноса ензима. Тако, на пример, потврђено је да је хемијски претретман сојине и сунцокретове сачме, као и уљане погаче, значајно унапредио биосинтезу α -амилазе на овим супстратима, при чему су приноси ензима износили и до 39,97 IU g⁻¹.

Утицај ултразвучног и микроталасног претретмана зависио је од врсте продукованог ензима, али је генерално значајно утицао на кинетички профил биосинтезе свих ензима. Како је на основу увида у литературу, биосинтеза свих испитиваних хидролитичких ензима подложна регулаторним механизмима, нарочито индукцији супстратом и катаболичкој репресији, претпостављено је да се услед дејства ултразвука великог интензитета мења хемијски састав подлоге, што има снажан утицај на регулаторне механизме, а затим је ова претпоставка и потврђена на основу хемијске анализе третиране подлоге. Установљено је да под утицајем ултразвука долази до ослобађања протеина и хемицелулозе услед разградње њихових комплекса са целулозом, па чак и до њихове парцијалне хидролизе, што је проузроковало повећање садржаја редукујућих шећера и пептида мање молекулске масе. Ова промена хемијског састава позитивно је утицала на биосинтезу целулаза и протеаза на сојиној и сунцокретовој сачми, али је проузроковала катаболичку репресију при биосинтези амилаза и пектиназа. Са друге стране, ултразвучни претретман при амплитуди 50% се показао као најбољи избор за производњу пектиназа када је као супстрат коришћена уљана погача, док је хемијски претретман био ефикаснији за производњу истог ензима на сојиној и сунцокретовој сачми. Поред тога, микроталасним претретманом је могуће постићи висок принос пектиназа на пшеничним мекињама, и до 59,40 IU g⁻¹. Показано је и да интензитет ултразвучног претретмана значајно утиче на принос ензима. Тако је на пример највећи принос целулаза постигнут на сојиној сачми применом ултразвука амплитуде 50%, док су оптимални услови за добијање целулаза на погачи заосталој након цеђења маслиновог уља подразумевали ултразвучни претретман амплитудом 25%.

Када је у питању избор претретмана супстрата у циљу добијања протеаза, хемијски претретман, нарочито алкални, се показао као најефикаснији. Повећање протеолитичке активности са 0,96 на 28,20 IU g⁻¹ потврђено је након алкалног претретмана сојине сачме, док је алкални претретман сунцокретове сачме проузроковао повећање приноса ензима око 6 пута (од 3,22 на 18,10 IU g⁻¹) и уљане погаче око 5 пута (од 3,0 до 15,07 IU g⁻¹). Очигледно је такође да је базни претретман кукурузне плеве утицао на повећање садржаја протеаза у екстракту након ферментације (50,51 IU g⁻¹). Детаљном анализом добијених резултата и поређењем приноса ензима у погледу активности на различитим супстратима, који су претретирани различитим техникама, утврђено је да је сојина сачма најбољи супстрат за гајење новоизолованог соја, па је следећи корак након селекције производног микроорганизама и подлоге, пажња посвећена издвајању добијених ензима из проферментисане подлоге.

Након биосинтезе ензима, следећи битан и изузетно комплексан корак је њихово издвајање из ферментационог медијума. У том смислу, највећа пажња је била посвећена екстракцији ензима као првом кораку издвајања ензима у случају технике

гајења на чврстом супстрату. Конвенционални поступци екстракције суочени су са великим бројем технолошких проблема попут високе цене растварача и сепарационих поступака, ниског приноса, мале продуктивности, као и великих губитака ензимске активности у току изоловања. Након производње веће количине ферментационе смеше под оптималним условима, испитане су различите методе и услови екстракције ензима у циљу остваривања највећег приноса ензима, али и добијања концентрованих препарата великог степена чистоће. Прво је испитан утицај различитих параметара при конвенционалној екстракцији ензима попут времена екстракције, рН, односа супстрат/растварач и брзине мешања на принос ензима изражен у јединицама ензимске активности. Утицај параметара у току конвенционалне екстракције испитан је методологијом одзивних површина, односно методом планираних експеримената. Ова метода која се заснива на истовременом варирању већег броја параметара у складу са претходно утврђеним експерименталним планом и статистичкој обради добијених резултата омогућава квантитативни увид у утицај сваког од испитиваних параметара на екстракцију ензима, као и њихову међусобну интеракцију. На основу добијених модела који описују принос екстракције амилаза, протеаза и целулаза у зависности од наведених параметара, могу се значајно дефинисати оптимални услови екстракције за сва три ензима. Међутим, оптимални услови екстракције ензима су специфични за сваки ензим, односно значајно зависе од својстава самог ензима, његове молекулске масе, растворљивости и стабилности, тако да се потпуно другачији резултати добијају у случају екстракције α -амилаза, протеаза и целулаза. Тако, на основу добијеног модела, може се закључити да на екстракцију протеаза највећи утицај има рН вредност и да се она значајно унапређује у алкалној средини, док повећање брзине мешања у току екстракције као и односа чврста супстанца/растварач негативно утичу на екстракцију. Са друге стране, екстракција целулаза треба да се изводи при великој брзини мешања, што указује на могућност да је целулаза чврсто адсорбована на супстрату и да су потребне јаче смицајне силе да би се она ослободила у екстракциони медијум. И у овом случају, повећава се принос ензима са повећањем количине растварача, али је могуће ефикасно изоловати ензим и при мањим утрошцима екстракционог средства, ако је брзина мешања велика. Ово је од значаја за индустријску производњу јер се у том случају постиже већи садржај суве материје и нису потребни захтевни кораци концентровања ензима након екстракције.

Како би се испитала потенцијална могућност унапређења екстракције ензима из проферментисане подлоге испитан је утицај ултразвука на екстракцију ензима и упоређени су резултати приноса ензима постигнути класичном и ултразвучном екстракцијом. Утврђено је да је ултразвук значајно убрзао процес екстракције тако да се максимални приноси сва три ензима постижу за краће време. Вероватно да је ултразвук унапредио кинетички профил изоловања ензима због кавитационог феномена који може да проузрокује разлагање нековалентних веза ензима са ћелијским структурама и компонентама подлоге, али и да унапреди пренос масе. У поређењу са конвенционалном екстракцијом, поред интензификације процеса, ултразвучна екстракција омогућава да се постигне већи принос протеолитичких ензима за око 50% у значајно краћем времену (2,5 min) и при већем односу супстрат/растварач. Иако се велики приноси α -амилазе могу постићи применом оба начина екстракције (≥ 825 IU), ултразвучна екстракција има значајне предности и у случају изоловања овог ензима јер се процес скраћује и добијају се мање разблажени узорци.

Гајењем микроорганизама на чврстој подлози остварује се, поред производње ензима, смањење антинутритивних компонената у подлози и повећање биолошког капацитета, а резултати овог дела докторске дисертације су приказани и дискутовани у потпоглављу *Унапређење биолошког и антинутритивног профила сојине сачме након*

ферментације сојем B. subtilis. Испитивањем утицаја садржаја воде на принос ензима уочено је да је овај параметар значајан, не само за принос ензима, већ и за нутритивни и антинутритивни профил сојине сачме. Наиме, потврђено је да је могуће смањити садржај трипсин инхибитора у сојиној сачми након 8 дана ферментације са $16,01 \pm 1,3$ на $10,66 \pm 0,4$ mg/g с.м. уколико је садржај воде у супстрату 1:0,5. Међутим, значајно смањене садржаја трипсин инхибитора од око 75% постигнуто је са повећањем садржаја воде на 1:1. Затим, повећање садржаја воде у систему довело је до смањења садржаја фитинске киселине. Свеукупно, садржај фитинске киселине је смањен за око 60% у поређењу са полазним садржајем у сојиној сачми након 8 дана ферментације помоћу *Bacillus sp.* ТМФ-1. Исто тако, са повећањем садржаја воде у сојиној сачми у интервалу од 1:0,5 до 1:1 садржај укупних фенола је удвостручен и износио је $949,64 \pm 45,12$ mg GAE/100g с.м. Како се са променом садржаја воде значајно мења садржај укупних фенола у проферментисаној подлози, очекивано је и повећање антиоксидативног потенцијала подлоге. Тако, са повећањем садржаја воде способност инхибиције DPPH радикала значајно расте и то са $35,91 \pm 2,71$ на $90,56 \pm 5,39\%$, што је забележено након трећег дана ферментације. Показано је, такође, да способност инхибиције ABTS радикала има исти тренд као способност инхибиције DPPH радикала, односно са повећањем садржаја воде способност инхибиције ABTS радикала се повећава са 57,72 на 96,11%. Добијени резултати су одличан показатељ да је пажљивом оптимизацијом процеса, која укључује избор микроорганизама, супстрата и технике претретмана могуће агроиндустријски отпад превести у производ са додатом вредношћу, који се може безбедно користити у хранивима за животиње уз поштовање принципа економичности и еколошке прихватљивости процеса.

У поглављу *Закључци* јасно и прегледно су изнети закључци изведени на основу резултата представљених у претходним поглављима који су у сагласности са постављеним циљевима рада.

У поглављу *Литература* дат је списак коришћене литературе.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Нагли развој индустрије и пољопривреде значајно је утицао на генерисање великих количина отпада за које је потребно пронаћи одговарајуће одрживо решење при чему се значајно доприноси заштити животне средине, а самим тим и здрављу људи. Агроиндустријски отпад се генерише у великом обиму на годишњем нивоу који се до скоро третирао као производ који је потребно одбацити, тачније производ који нема никакву вредност. Међутим, развојем нових биотехнолошких процеса могуће је ову врсту отпада превести у производе са додатном вредношћу. Агроиндустријске сировине су богате протеинима, ферментабилним шећерима, али и минералним материјама и витаминима, што је од есенцијалног значаја за раст микроорганизама. Искоришћење агроиндустријског отпада у циљу производње ензима, биолошки активних компонената и производа унапређених својстава, веома често се посматра у контексту гајења микроорганизама на чврстој подлози. Сходно томе, у овој докторској дисертацији проучава се могућност искоришћења различитих агроиндустријских сировина мање комерцијалне вредности попут сојине сачме, сунцокретове сачме, пшеничних мекиња, кукурузне плевеве, погаче заостале након цеђења маслиновог уља као подлоге за раст микроорганизама, при чему се добијају индустријски значајни ензими: α -амилазе, протеазе, пектиназе и целулазе. Избор микроорганизама продуцента је једна од критичних тачака у технолошком процесу производње ензима. Наиме, микроорганизам- продуцент не сме да буде токсичан и патоген уколико је намена

примена у прехранбеној индустрији. Сходно томе, велики допринос ове дисертације је коришћење природног изолата *B. subtilis* соја који је секвенционисан и идентификован као *B.subtilis* ТМФ-1, док је његова 16S rDNA секвенца депонована у банци гена под бројем No. KX960141 (NCBI Genbank), чиме је обogaћена колекција микроорганизама који имају „GRAS статус“ (на енгл. *generally recognized as safe*).

Примена микроорганизама са циљем да се агроиндустријске сировине и отпадни пољопривредни токови искористе као подлоге за добијање индустријски значајних ензима захтева пажљиву оптимизацију процеса. Добијени и изоловани сој (*B.subtilis* ТМФ-1) је коришћен за ферментацију на чврстој подлози са основним циљем да се испита могућност одабраног микроорганизама да произведе жељене ензиме при различитом односу супстрат/вода коришћењем за раст различитог агроиндустријског отпадног материјала као што су: пшеничне мекиње, сојина сачма, уљана погача, сунцокретова сачма и друго. Праћењем састава хранљиве подлоге и приноса ензима у току ферментације одабраним сојем, утврђено је да се агроиндустријске сировине могу превести у још бољи медијум за раст уколико се подвргну одређеним претретманима, како конвенционалним хемијским техникама за нарушавање комплексне структуре супстрата киселинама и базама, тако и применом иновативних технологија као што су технологија ултразвука високог интензитета и микроталаса. Према томе, поменуте агроиндустријске сировине су претретирани хемијски коришћењем киселина и база, али и применом технологије ултразвука и микроталаса и коришћене за микробиолошку производњу ензима.

Затим, у овој докторској дисертацији је приказан утицај конвенционалних техника за екстракцију ензима из проферментисане подлоге, али и иновативних технологија као што је технологија ултразвука високог интензитета, чиме је овом докторском дисертацијом дат значајан допринос у области разумевања процеса екстракције добијених ензима из проферментисаног агроиндустријског отпада и створена је основа за планирање даљих фаза пречишћавања ензима. Применом експерименталних планова и методологије одзивних површина пажљиво су оптимизовани процесни параметара екстракције, која се изводи у шаржним условима уз орбитално мешање, и добијени су математички модели са дефинисаним максимумима на основу којих је могуће предвидети утицај рН пуфера за екстракцију, времена екстракције, односа супстрата и растварача, времена екстракције као и брзине мешања на принос α -амилаза, целулаза и протеаза. Коришћењем конвенционалних техника и технологије ултразвука праћењем приноса ензима добија се јасна слика како примењени физичко/хемијски процеси у току екстракције утичу на поједине угљенохидратне и протеинске фракције агроиндустријског отпада.

Теза значајно доприноси и разумевању утицаја времена ферментације и садржаја воде на профил антинутритивних компонената у сојиној сачми након ферментације. Детаљно је приказан профил трипсин инхибитора и фитинске киселине у сојиној сачми, а затим је процењена и биолошка активност сојине сачме коришћењем две методе и то способности инхибиције DPPH и ABTS радикала, док је садржај укупних полифенола праћен коришћењем стандардне спектрофотометријске методе. Поред тога, предмет истраживања ове докторске дисертације представља значајан допринос развоју нових модела и технологија за валоризацију агроиндустријских сировина. Савременост и оригиналност ове докторске дисертације потврђени су публикавањем радова из тезе у међународним часописима и саопштењима на скуповима међународног и националног значаја.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Током израде докторске дисертације кандидат је извршио детаљан преглед научне и стручне литературе из релевантних научних области везаних за проблематику докторске дисертације. Цитирана су 170 литературна навода која су омогућила да се јасно представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Већину прегледане литературе чине радови публиковани у врхунским међународним часописима од стране еминентних стручњака у испитиваној научној области. На основу овог пресека стања у литератури изложене су основне смернице за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из пописа литературе која је коришћена у истраживању, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

Циљеви постављени у оквиру ове докторске дисертације остварени су и доказани коришћењем поузданих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода које су доступне у литератури или су модификоване и прилагођене специфичним захтевима истраживања, као и адекватном анализом и обрадом података.

Један од циљева ове докторске дисертације је селекција микроорганизама, продуцента, који ће се користити за производњу значајних индустријских ензима гајењем на чврстом агроиндустријском отпаду. Приликом селекције микроорганизама одабрана је богата колекција природних и комерцијалних сојева доступних на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију који су примарно испитани са аспекта потенцијала за производњу α -амилаза, протеаза, пектиназа и целулаза. Примарни скрининг микроорганизама извршен је гајењем одабраних микроорганизама (углавном бактерија) коришћењем селективних агарних подлога обогаћених скробом, казеином, пектином и карбоксиметилцелулозом. Након 72 h инкубације микроорганизама на селективним подлогама, агарне плоче са казеином су натопљене 10% раствором трихлорсирћетне киселине, док су плоче обогаћене пектином, скробом и карбоксиметилцелулозом натопљене Луголовим раствором. Микроорганизам који даје најширу провидну зону је даље подвргнут секвенционисању и идентификацији. За идентификацију одабране бактерије коришћена је чиста бактеријска култура, изолована DNK, односно 16S rRNK ген. Укратко, геномске DNK су изоловане фенол-хлороформском методом, а затим су за добијање парцијалне или скоро целе секвенце гена за 16S rRNK коришћени прајмери UNI16SF 50-GAG AGT TTG ATC CTG GC-30 и UNI16SR 50-AGG AGG TGA TCC AGCCG-30. За амплификацију гена коришћена је PCR техника при следећим условима: денатурација на 95 °C у трајању 5 минута, 30 циклуса на 96 °C у трајању 30 s, 55 °C у трајању 60 s и 72 °C у трајању 1 минут, са коначном екстензијом на 72 °C у трајању 5 минута. Секвенцирање је извршено Сангеровом методом, а секвенце су поравнате ради поређења у односу на јавно доступну референтну базу података.

За карактеризацију супстрата на бази агроиндустријске биомасе коришћене су стандардне аналитичке методе. Садржај азота је мерен по методи по Кјелдалу (Kjeldal), садржај масти по методи по Сокслету (Soxlet); садржај воде методом сушења до константне масе, садржај пепала спаљивањем. Ферментација агроиндустријског отпада одабраним и идентификованим бактеријским сојем извођена је у шаржно при чему је испитан утицај времена ферментације (12-196 h), садржаја воде и претретмана на принос хидролитичких ензима. Пре извођења ферментације испитан је капацитет везивања воде сваког појединачног супстрата, стандардном гравиметријском методом.

Принос хидролитичких ензима утврђиван је праћењем садржаја протеина коришћењем стандардне методе по Лорију (Lowry) и активности ензима коришћењем методе за одређивање протеолитичке активности засноване на дигестији азо-казеина протеазама, која је развијена на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију, док су активности пектиназа, целулаза и α -амилаза праћене динитросалицилном методом, којом се утврђује концентрација редукујућих шећера.

Приликом оптимизације услова екстракције произведених ензима из проферментисанг агроиндустријског отпада, коришћена је методологија одзивних површина помоћу које су анализирани интеракције између независно и зависно променљивих параметара процеса и утврђене и решене мултиваријабилне једначине. Кошришћен је Вох-Веһкен (ВВD) дизајн за испитивање екстракције ензима. Испитивани параметри су рН пуфера за екстракцију (7–9), брзина мешања ($50\text{--}550\text{ min}^{-1}$), време екстракције (15–45 минута) и однос чврсто/течно (1:20-1:50). Зависно променљиве су хидролитичка активност протеаза/целулаза/ α -амилаза у сировом екстракту добијеном из 5 g проферментисаног супстрата. Обрада резултата извршена је коришћењем програма Design Expert[®] (Stat-Ease, Inc.; Minneapolis, USA; верзија 7.0.0), док је статистичка анализа извршена коришћењем средњих вредности добијених резултата.

Антинутритивни профил супстрата након ферментације у погледу садржаја инхибитора трипсина праћен је коришћењем доступних литературних метода, док је метода за праћење садржаја фитинске киселине додатно оптимизирана у току експерименталног рада. За одређивање садржаја укупних полифенола коришћена је стандардна спектрофотометријска метода. Билошка активност проферментисане подлоге праћена је стандардним методама које се заснивају на способности инхибиције 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала (DPPH) и способности неутрализације радикалног катјона 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS).

3.4. Применљивост остварених резултата

Интензиван пораст популације удружен са економским растом привлачи значајна улагања у прехранбену и пољопривредну индустрију, што утиче на убрзан развој ових грана индустрије. Са повећањем индустријализације пољопривредног сектора, настају велике количине споредних материјала и отпадних токова које представљају значајан изазов за животну средину. Агроиндустријски отпад представља споредни производ који настаје у пољопривредној индустрији приликом примарне обраде сировина. Уколико се овакав отпад неконтролисано испушта у животну средину уз непоштовање одговарајућих безбедносних процедура врло је вероватно да ће изазвати загађење животне средине и утицати штетно на здравље људи и животиња. Велика количина агроиндустријског отпада је неискоришћена и нетретирана па се у бројним извештајима могу пронаћи подаци о уништавању оваквог отпада спаљивањем, непланираним складиштењем и прављењем депонија. На овај начин значајно се нарушава квалитет животне средине јер овакво складиштење агроиндустријског отпада удружено са климатским променама појачава емисију гасова и ефекат стаклене баште. Агроиндустријски споредни производи су веома често варијабилног састава, али у основи то су лигноцелулозни материјали изграђени од полисахарида целулозе и хемицелулозе умрежене ароматичним полимером, лигнином, богате протеинима, минералима, витаминима, липидима, пектином и полифенолима. Сходно томе, овакав нутритивни профил агроиндустријских сировина указује да се ради о изузетним сировинама за добијање и развој нових производа. Наиме, хемијски састав оваквог

материјала обезбеђује идеалну средину за раст микроорганизама. Тако, микроорганизми имају способност да кроз ферментационе процесе користе компоненте сировине и дају производе са додатом вредношћу или служе као извор обновљиве енергије. Дакле, агроиндустријски споредни производи и отпадни материјали као што су сојина сачма, сунцокретова сачма, пшеничне мекиње, кукурузна плева, погача заостала након цеђења уља и други, представљају јефтину и лако доступну подлогу, концентрован извор нутријената за раст микроорганизама чијим искоришћењем као подлоге у биотехнолошком процесу је задовољен концепт „циркуларне економије, где се отпад једне гране индустрије користи као сировина у другој.

С обзиром на значај и актуелност теме и резултате добијене у оквиру ове докторске дисертације може се закључити да остварени резултати ове дисертације имају велики потенцијал за валоризацију агроиндустријских споредних производа и отпадних токова. Наиме, резултати ове докторске дисертације се могу применити за развој новог биотехнолошког поступка ферментације на агроиндустријским сировинама помоћу новоизолованог бактеријског изолата, чија је секвенца утврђена и сој идентификован микробиолошким и гентичким методама. Изоловани и идентификовани бактеријски сој се показао као изузетан продуцент индустријски значајних ензима. Затим, развијен је и оптимизован целокупан поступак екстракције добијених ензима у високом приносу што је могуће применити у развоју процеса издвајања и пречишћавања ензима у облику који захтевају комерцијално доступни ензимски препарати. Ферментацијом агроиндустријског отпада добијен је високовредан додаток хранивима за животиње обogaћен протеинима и биолошки активним компонентама. Такође, резултати ове докторске дисертације могу да се примене за добијање сировине унапређеног нутритивног профила у погледу садржаја инхибитора трипсина и фитинске киселине, чиме се искоришћеност хранљивих компонената значајно повећава.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Научни допринос ове докторске дисертације представља развој иновативног биотехнолошког поступка за производњу индустријски значајних ензима и превођење лигноцелулозне биомасе у производе са додатном вредношћу. Појединачни доприноси ове докторске дисертације су:

- Изолован је нови сој из поквареног крављег млека који се показао као најпродуктивнији за синтезу амилаза, целулаза, протеаза и пектиназа међу неколико десетина тестираних комерцијалних и изолованих сојева. Нова бактеријска врста *Bacillus* spp. показала се као најбољи продуцент хидролитичких ензима током раста на селективним подлогама, али и реалним индустријским супстратима попут сојине и сунцокретовете сачме, уљане погаче, кукурузних љуски, пшеничних мекиња и других. Изолат је идентификован на основу стандардних биохемијских и морфолошких карактеристика, као и на основу савремених гентичких техника на основу секвенционирања 16S rDNA, као припадник *Bacillus* spp., са највећом сродношћу са *Bacillus thuringiensis* и означен је као *Bacillus* sp. ТМФ-1, док је његова 16S rDNA секвенца депонована у банци гена под бројем No. KX960141 (NCBI Genbank);
- Оптимизован је процес ферментације на неколико лигноцелулозних сировина помоћу новоизолованог соја и остварен је повећан принос циљаних хидролитичких ензима од значаја за индустрију, амилаза, протеаза, пектиназа и

целулаза као резултат пажљиве оптимизације процесних параметара и претретмана супстрата;

- На основу проучавања утицаја хемијског, ултразвучног и микроталасног претретмана лигноцелулозног супстрата на принос хидролитичких ензима, а на основу промена у хемијском саставу хранљиве подлоге услед њиховог дејства, утврђен је значај индукције и катаболичке репресије на биосинтезу амилаза, целулаза, пектиназа и протеза, што доприноси разумевању регулаторних механизма у биосинтези ових ензима;
- Детаљно је оптимизован поступак екстракције произведених ензима из проферментисане подлоге као уводни корак за добијање високопречишћених ензимских препарата. Оптимизовани су параметри при конвенционалној екстракцији амилаза, протеаза и целулаза и добијени су математички модели на основу којих може да се процени утицај рН пуфера за екстракцију, времена екстракције, односа супстрат/растварач и интензитета мешања на принос наведених хидролитичких ензима;
- Развијен је процес екстракције применом ултразвука високог интензитета при фреквенци 20 kHz и амплитуди 10% при контролисаном температурном режиму, који је довео до интензификације и унапређења процеса екстракције сва три ензима;
- Посебан допринос ове докторске дисертације је повећање нутритивне вредности сојине сачме и биолошке активности након ферментације, чиме се проширује и подиже на један виши ниво примена ове агроиндустријске сировине. Утврђена је корелација између времена трајања ферментације, иницијалног садржаја воде у супстрату и садржаја антинутритивних компонената супстрата, инхибитора трипсина и фитинске киселине. Такође, дефинисани су и утврђени оптимални процесни параметри за повећање садржаја полифенолних једињења ферментацијом сојине сачме помоћу *B. subtilis* ТМФ-1 и успостављена је корелација између садржаја полифенола и антиоксидативног капацитета коришћењем DPPH и ABTS методе.

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне литературе која разматра гајење микроорганизама на чврстом агроиндустријском отпаду са циљем производње индустријски значајних ензима и унапређење антинутритивног профила и биолошке активности, као и анализом добијених резултата, уочава се да резултати из ове докторске дисертације допуњују постојећа сазнања из поменуте области. Конкретније, правилном селекцијом микроорганизама као и супстрата за њихов раст, али и основних процесних параметара, могуће је метаболизам микроорганизама усмерити у правцу добијања жељеног производа. Такође, припремом супстрата, односно увођењем корака претретмана супстрата, квалитет подлоге за гајење се може додатно побољшати са аспекта приноса ензима. Ова докторска дисертација потврђује да се услед секреције одређених хидролитичких ензима, који настају као последица метаболизма микроорганизама, разграђују комплексне структуре супстрата попут комплекса целулозе и протеина, чиме се садржај протеина и протеински профил у подлози може значајно унапредити. Поред тога, могуће је смањити садржај нежељених компонената. Зато, ова докторска дисертација представља оригинални допринос у погледу развоја биотехнолошког поступка за смањење садржаја антинутритивних компонената, али и повећање

нутритивних, биолошки активних једињења, чиме је агроиндустријска сировина мање комерцијалне вредности преведена у производ са додатом вредношћу.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Abdalla Ali Salim, маг. инж. технол., је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдио објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштењима на скуповима међународног и националног значаја. Из ове докторске дисертације проистекли су следећи резултати: један рад у међународном часопису изузетних вредности (M21_a) и један рад у међународном часопису (M23), једно саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33) и једно саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34). Кандидат се током израде дисертација бавио истраживачким радом у оквиру научних области биохемијског инжењерства и биотехнологије.

Радови објављени у часописима међународног значаја (M20)

Рад у међународном часопису изузетних вредности (M21_a)

- **Abdalla Ali Salim**, Sanja Ž. Grbavčić, Nataša Ž. Šekuljica, Andrea B. Stefanović, Sonja M. Jakovetić Tanasković, Nevena D. Luković, Zorica D. Knežević-Jugović, "Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods", *Bioresource Technology*, vol. 228, 2017, pp. 193–200, IF (2017)=5,807, ISSN: 0960-8524.

Рад у међународном часопису (M23)

- **Abdalla Ali Salim**, Sanja Ž. Grbavčić, Nataša Ž. Šekuljica, Maja Vukašinović-Sekulić, Jelena R. Jovanović, Sonja M. Jakovetić Tanasković, Nevena D. Luković, Zorica D. Knežević-Jugović, "Enzyme production by solid-state fermentation on soybean meal: A comparative study of conventional and ultrasound-assisted extraction methods", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 63, 2019, pp. 361–368, IF(2018)=1,559, ISSN: 0885-4513.

Зборници међународних научних скупова (M30)

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33)

- Šekuljica, N., **Ali Salim, A.**, Lukovic, N., Jovanovic, J., Jakovetic Tanaskovic, S., Grbavcic, S., Kneževic-Jugovic, Z.: Solid-state fermentation of soybean meal: hydrolytic enzymes production and improvement in bioactivity, Editors: Markoš, J., Mihal, M., In 46th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia, May 20-23, 2019., Proceedings pp. 102-1–102-10, ISBN: 978-80-8208-011-0.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)

- Luković, N., **Ali Salim, A.**, Grbavčić, S., Jakovetić Tanasković, S., Jovanović, J., Šekuljica, N., Knežević-Jugović, Z., Effect of moisture content on enzyme production by solid state fermentation on soybean meal, In: Vladimir Kakurinov, prof. Dr (editor): Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress-NUTRICON 2019,

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације **Abdalla Ali Salim**, маг. инж. технол., под називом **„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus*“** („**Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.**“), сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Технолошко инжењерство, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на конференцијама од међународног и националног значаја. Такође, комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научноистраживачку способност у свим фазама израде ове докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом **„Производња хидролитичких ензима ферментацијом на пољопривредном отпаду помоћу различитих врста из рода *Bacillus*“** („**Production of hydrolytic enzymes by fermentation on agricultural by-products using *Bacillus* sp.**“) кандидата Abdalla Ali Salim прихвати, изложи на увид јавности и упути на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

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

Др Мирјана Антов, редовни професор Универзитета у Новом Саду, Технолошки факултет

Др Невена Луковић, научни сарадник Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Наташа Шекуљица, научни сарадник Иновационог центра Технолошко-металуршког факултета у Београду