

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Невене В. Илић, мастер инжењера технологије

Одлуком Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, одлука бр. 35/213 од 28.8.2024. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Невене В. Илић, мастер инжењера технологије, под насловом **Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре.**

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

- Школске 2018/2019. године, кандидат Невена Илић, мастер инжењера технологије, уписала је докторске академске студије на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију, Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду под менторством Др Сузанае Димитријевић-Бранковић, редовног професора.
- 18.11.2021. (одлука бр. 35/291), Кандидат Невена Илић, мастер инжењер технологије, предложила је тему докторске дисертације под називом: „**Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре**“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду усвојило је Комисију за оцену научне заснованости предложене теме.
- 23.12.2021 (одлука бр. 35/368), На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата за израду докторске дисертације, а за ментора је именована др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- 19.1.2022. (одлука бр. 61206-171/2-22), На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата Невене Илић, мастер инжењера технологије, под називом „**Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре**“

- 11.4.2024. На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука бр. 35/66 о прихватању именовања другог ментора др Катарине Михајловски, виши научни сарадник Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду поред претходно именованог ментора др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- 22.4.2024. (одлука бр. 61206-1481/2-24), На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог именовања другог ментора др Катарине Михајловски, вишег научног сарадника Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- 28.8.2024. (одлука бр.35/213), на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука о именовању чланова Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Невене Илић, мастер инжењера технологије, под називом „**Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре**“

1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду матична установа. Ментори ове докторске дисертације су др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду и др Катарина Михајловски, виши научни сарадник Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду које су, на основу досадашњих објављених научних радова и искуства компетентне да руководе изразом ове докторске дисертације.

1.3. Биографски подаци о кандидату

Невена В. Илић рођена је 22.12.1994. године у Ужицу. Основну школу „Саво Јовановић Сирогојно” у Сирогојну је завршила као ђак генерације 2009. године након чега је уписала друштвено-језички смер Ужичке гимназије. Након завршене гимназије, 2013. године, уписује се на модул Екологија на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, где је 2017. године дипломирала са просечном оценом 9,60, чиме је стекла звање дипломирани биолог. Током основних академских студија била је учесник неколико конференција из области заштите животне средине и одрживог развоја, као и водич волонтер у Ботаничкој башти „Јевремовац”. У октобру 2017. године, Невена уписује мастер академске студије на Катедри за инжењерство заштите животне средине, Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, које је завршила 2018. године са просечном оценом 9,29 и оценом 10 на завршном мастер раду. Октобра исте године, као први кандидат на ранг листи, уписује докторске академске студије на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију, Технолошко–металуршког факултета Универзитета у Београду под менторством проф. др Сузана Димитријевић-Бранковић. Током свог факултетског образовања, а све до ступања у радни однос (март 2019. године) била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. У марту 2019. год. ступа у радни однос као истраживач приправник на Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета, у оквиру националног позива за укључивање 100 талентованих младих истраживача у научно-истраживачке пројекте, које је расписало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, 2018. године. Тада је ангажована на пројекту под називом ”Примена биотехнолошких метода у одрживом искористићењу нус-производа агроиндустрије (ТР 31035), којим је руководила проф. др Сузана Димитријевић-Бранковић. У оквиру докторских академских студија положила је све испите предвиђене

студијским програмом, са просечном оценом 9,64. Завршни испит на докторским академским студијама под називом „Производња лаказа гљивама беле трулежи и њихова потенцијална примена у различитим индустријским гранама”, одбранила је са оценом 10, дана 30.09.2020. године.

У периоду од 2020. год. до 2022. год. била је ангажована на пројекту ”Доказ концепта”(Proof of concept (PoC5634) под називом ”*Green biocatalyst for decolorization and degradation of azo dyes from industrial wastewater: a white rot fungal laccase immobilized on recycled agroindustrial waste*”, којим је руководила др Катарина Михајловски. Такође, у периоду од октобра до децембра 2021. године боравила је на Факултету за хемију и хемијско инжењерство, на Унивезитету у Марибору ради усавршавања у области имобилизације ензима лаказе. У звање истраживача сарадника изабрана је 10.3.2022. године.

На VIII међународном конгресу „*Engineering, Environment and Materials in Process Industry*” који је одржан на Јахорини у периоду од 20.-23. марта 2023. године, награђена је за најбољу постер презентацију под називом ”*Application of crude fungal laccase from Ganoderma spp. in decolorization of triphenylmethane dye, crystal violet*”. Такође, у јануару 2024. године добила је сертификат за успешно завршену обуку под називом „Прописи из области заштите животне средине: од теорије до праксе” коју је реализовало Минситарство заштите животне средине Републике Србије и Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду у периоду од новембра 2023. год. до јануара 2024. год. Учествовала је у изради екперименталног дела неколико завршних и мастер радова током својих докторских академских студија. На 66. Међународном сајму технике, који је одржан у периоду од 21. до 24. маја 2024. године, излагала је свој експонат под називом ”*Зелени биокатализатор на бази агроиндустријског лигноцелулозног отпада за уклањање азо боја*”.

Аутор је или коаутор једног поглавља у књизи (M13), шест радова у међународним часописима (четири рада у M21, једног рада у M22, једног рада у M23), четири саопштења са међународних конференција штампана у целисти (M33) и пет саопштења са међународних конференција штампана у сажетку (M34).

2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација, кандидата Невене Илић, мастер инжењера технологије, под називом: „**Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре**“ је написана на 164 нумерисане стране, са укупно 7 поглавља и 5 прилога. Укључује 96 слика (71 у тексту и 25 у прилогу), 18 табела (14 у тексту и 4 у прилогу) и 272 литературна навода. Дисертација садржи следећа поглавља: *Увод, Теоријски део, Циљ рада, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература*. На почетку дисертације дат је *Резиме* на српском и енглеском језику. На крају дисертације дата је биографија кандидата, као и изјаве о ауторству, истоветности електронске и штампане верзије докторске дисертације и о коришћењу. По својој форми и садржају, поднети рад задовољава све стандарде докторске дисертације.

2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У **Уводу** дисертације указано је на потребу коришћења агроиндустријског лигноцелулозног отпада у циљу његове минимализације и производње микробних ензима, пре свега лаказа. Истакнут је значај гљива беле трулежи у поступку производње ензима лаказе, са посебним освртом на поједине представнике произвођаче ове групе ензима као што су врсте рода *Trametes* и *Ganoderma*. Указано је на могућност примене слободних гљивичних лаказа у поступцима уклањања азо боја отпадних вода текстилне индустрије и

тетрациклина. Такође, представљен је значај поступка имобилизације ензима, како би се ензим могао више пута применити у различитим индустријским и биотехнолошким поступцима. Истакнута је и примена агроиндустријског лигноцелулозног отпада некоришћеног или већ коришћеног у поступку производње ензима, у поступку имобилизације ензима. Наведен је план истраживања и основни циљеви докторске дисертације.

Теоријски део је подељен на четири тематске целине (*агроиндустријски отпад, лаказе, примена лаказа у биоремедијацији и биоразградњи, имобилизација ензима*).

У **првој тематској целини** наведени су главни разлози акумулације агроиндустријског отпада у животној средини. Такође, обрађена је и тема лигноцелуложне биомасе, која представља највећи део агроиндустријског отпада на глобаном нивоу. Приказани су подаци о хемијском саставу лигноцелуложне биомасе, као и хемијска структура основних градивних јединица лигноцелуложне биомасе. Додатно је представљен механизам разградње лигноцелуложне биомасе.

У **другој тематској целини** је описано откриће, порекло и улога лаказа код организама произвођача ензима. Такође, дат је приказ гљива произвођача лаказа, са посебним освртом на гљиве беле трулежи и експресију лаказних гена код њих. У оквиру ове тематске целине представљена су хемијска, као и биохемијска својста ензима лаказе. Такође, приказана је и класификација лаказа, као и преглед фактора који утичу на производњу овог ензима уз посебан осврт на производњу лаказе коришћењем агроиндустријског лигноцелуложног отпада.

У **трећој тематској целини** дат је преглед примене лаказа гљива беле трулежи у поступцима биоразградње различитих ксенобиотика, са посебним освртом на примену лаказа у биоразградњи азо боја и тетрациклина у отпадним водама различитих индустрија.

У **четвртој тематској целини** представљене су методе имобилизације ензима. Посебно је истакнут значај примене агроиндустријског лигноцелуложног отпада као носача у поступку имобилизације лаказа гљива беле трулежи.

У поглављу **Циљеви рада** дат је основни циљ тезе и побројани су специфични циљеви.

Поглавље **Материјали и методе** садржи детаљан опис свих метода коришћених током израде дисертације. Прво је описана метода за изолацију гљива беле трулежи, а затим поступак молекуларне идентификације новоизолованих сојева. Описане су квалитативна, семи-квантитативна и квантитативна метода којом је утврђен ензимски потенцијал гљива, након чега је описан и поступак производње хидролаза и лаказа, гајењем гљива беле трулежи на четири различита типа лигноцелуложне биомасе (отпадна кафа, отпадни пивски јечам, сојина и сунцокретова сачма). Дат је приказ квантитативних тестова за одређивање активности ензима, као и поступак оптимизације производње лаказе на отпадном пивском јечму и карактеризације ензима лаказе (одређивање рН и температурног оптимума, рН и температурне стабилности и стабилности током складиштења лаказе). Описана је метода којом је испитан утицај различитих металних јона на активност лаказе, као и метода за одређивање молекулске масе лаказе. Након метода за карактеризацију лаказа, описан је и поступак примене слободне лаказе изолата *Coriolopsis trogii* 2SMKN у биоразградњи азо боја (*Orange G*, *Congo Red* и *Eriochrome Black T*) и њихове смеше из отпадних вода текстилне индустрије, уз детаљан приказ поступка оптимизације биоразградње. Такође, дат је и детаљан опис инструменталних метода коришћених у поступку карактеризације производа биоразградње азо боја (HPLC, GC-MS, LC-MS), као и тестова фитотоксичности и антимицробне активности добијених производа биоразградње.

Након тога, описан је поступак примене слободне лаказе *Ganoderma resinaceum* NMKSS у биоразградњи два тетрациклина, амрацина и довицина. Представљен је поступак оптимизације ензимске биоразградње као и HPLC метода, која је коришћена у поступку одређивања ефикасности биоразградње тетрациклина из отпадне воде. Поред тога, описан је

и тест антимикуробне активности тетрациклина, пре и након биоразградње слободном лаказом.

У поглављу је описана и метода имобилизације лаказа на агроиндустријски лигноцелулозни отпад (отпадни пивски јечам већ коришћен у поступку производње лаказе и отпадне љуске кикирикија), са приказом корака који су коришћени у поступку активације носача-агроиндустријског лигноцелулозног отпада пре саме имобилизације ензима, као и поступак оптимизације кључних параметара за успешну имобилизацију (рН, време имобилизације и концентрације понуђених протеина). Дат је и опис инструменталних метода коришћених у морфолошкој карактеризацији носача пре и након активације (SEM, FT-IR) и након имобилизације лаказе (FT-IR). Након тога, описана је поступак за утврђивање могућности поновне употребе имобилисаних ензима у биоразградњи азо боја, њихове смеше и тетрациклина. На крају, описан је и поступак којим је отпадни пивски јечам по други пут рециклиран за имобилизацију лаказе, након примене имобилисаних система у биоразградњи азо боја и њихове смеше.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата приказ резултата добијених у експерименталном делу у овој дисертацији, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са литературним подацима. Резултати и дискусија су представљени у седам потпоглавља. У **првом потпоглављу** приказани су резултати који се тичу изолације као и молекуларне идентификације новоизолованих сојева гљива беле трулежи из букове шуме са Авале.

У **другом потпоглављу**, приказани су резултати ензимског потенцијала пет новоидентификованих сојева гљива беле трулежи (*C. trogii* 2SMKN, *F. fomentarius* TMF2, *B. adusta* TMF1, *S. commune* TMF3 и *G. resinaceum* NMKSS), укључујући резултате квалитативног, семи-квантитативног и квантитативног теста ензимске активности. У **трећем потпоглављу** су приказани резултати производње лаказе сојева *C. trogii* 2SMKN и *G. resinaceum* NMKSS, гајењем на отпадном пивском јечму. Такође, приказани су резултати карактеризације произведених лаказа који обухватају молекулску масу лаказе, рН и температурни оптимум, стабилност лаказе на различитим температурама и рН, стабилност лаказе током периода складиштења од 12 месеци, као и активност лаказе након излагања различитим концентрацијама металних катјона.

У **четвртном потпоглављу**, приказани су резултати биоразградње азо боја (*Orange G*, *Congo Red* и *Eriochrome Black T*) и њихове смеше слободном лаказом из *C. trogii* 2SMKN. Такође, приказани су резултати утицаја различите концентрације боје, ензима, рН и температуре на степен обезбојавања све три азо боје, као и резултати HPLC, GC-MS и LC-MS анализе. Додатно, ради истицања потенцијала некомерцијалне лаказе из *C. trogii* 2SMKN у биоразградњи азо боја, приказани су и резултати биоразградње помоћу комерцијалне лаказе из *Aspergillus* spp. Табеларно и сликовито су приказани резултати теста фитотоксичности и антимикуробне активности.

У **петом потпоглављу** приказани су резултати биоразградње два тетрациклина, амрацина и довицина слободном лаказом из *G. resinaceum* NMKSS, са посебним освртом на резултате добијене током испитивања утицаја времена контакта амрацин-лаказа, утицаја различите концентрације лаказе и различите концентрације амрацина на ток биоразградње. У овом потпоглављу приказани су и резултати теста антимикуробне активности полазног тетрациклина и производа добијених њиховом биоразградњом.

У **шестом потпоглављу** приказани су резултати имобилизације лаказе из *C. trogii* 2SMKN на отпадни пивски јечам који је претходно коришћен у поступку производње овог ензима. Приказани су резултати SEM и FT-IR анализе, а графички су приказани резултати испитивања утицаја различите концентрације понуђених протеина, различитог времена имобилизације и различитог рН на имобилизацију, односно принос имобилизације и специфичну активност имобилисане лаказе. У овом потпоглављу су приказани резултати вишекратне примене имобилисане лаказе из *C. trogii* 2SMKN у биоразградњи азо боја (*Orange G*, *Congo Red* и *Eriochrome Black T*) и њихове смеше, као и резултати вишекратне

примене имобилисане комерцијалне лаказе из *Aspergillus* spp. за исту намену, кроз реакционе циклусе. На крају су приказани и резултати поновног коришћења отпадног пивског јечма у имобилизацији и обезбојавању, у новом поступку имобилизације лаказе из *C. trogii* 2SMKN.

У седмом потпоглављу, приказани су резултати имобилизације лаказе из *G. resinaceum* NMKSS на отпадне љуске кикирикија. Приказани су резултати SEM и FT-IR анализе, као и резултати испитивања утицаја различите концентрације понуђених протеина, различитог времена имобилизације и различитог рН на имобилизацију, односно принос имобилизације и специфичну активност имобилисане лаказе. Такође, приказани су и резултати виšekратне примене имобилисане лаказе у биоразградњи два тетрациклина, амрацина и довицина, кроз реакционе циклусе.

У поглављу **Закључак**, сумирани су најзначајнији резултати и сазнања проистекла из ове докторске дисертације.

У поглављу **Литература** наведене су све референце цитиране у докторској дисертацији.

3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

3.1. Савременост и оригиналност

Последњих година значајно је порасло интересовање за проучавање могућности искоришћења агроиндустријске лигноцелулозне биомасе, услед глобалне забринутости због економских и еколошких изазова, укључујући загађење. Агроиндустрија сваке године генерише велике количине отпада, који, уколико се не третира пре испуштања у животну средину, може довести до загађења и негативно утицати на здравље људи и животиња. Значајан део овог отпада остаје необрађен и недовољно искоришћен, што додатно доприноси емисији гасова стаклене баште. Са друге стране, агроиндустријска лигноцелулозна биомаса, због свог хемијског састава, представља исплатив и обновљив ресурс са великим потенцијалом за производњу енергије, што је од изузетне важности за савремено индустријско друштво. Недавно је посебно порасло интересовање за коришћење овог отпадног материјала у синтези производа високе вредности, као што су ензими и других биолошки активних једињења.

Лигноцелулозна биомаса је нарочито погодна за производњу лаказа, једне врсте лигнинолитичких ензима, јер обезбеђује јефтин извор хранљивих материја за микроорганлизме током синтезе ензима. Гљиве беле трулежи, познате по својој способности да ефикасно разграђују дрво, спадају у највеће произвођаче лаказа. Произведене лаказе се често користе у процесима биоремедијације и биоразградње ксенобиотика, посебно синтетичких боја које се широко примењују у свету. Употреба лаказа у ове сврхе представља еколошки прихватљиву алтернативу традиционалним физичко-хемијским методама, које могу бити скупе и неефикасне.

Поред уклањања синтетичких азо боја, лаказе изоловане из гљива беле трулежи показале су се веома ефикасним у уклањању антибиотика, који знатно доприносе загађењу животне средине, нарочито површинских вода. Одређени антибиотици, као што је пеницилин, лако се разграђују и елиминишу, док други, попут тетрациклина, имају већу постојаност и стога представљају све већу глобалну претњу биодиверзитету водених и копнених екосистема. Континуирано испуштање тетрациклина у животну средину нарушава деликатну равнотежу микробног екосистема, доприносећи настанку и ширењу резистентних сојева, чиме се угрожава и здравље људи.

Висока ефикасност слободних ензима лаказа у уклањању азо боја и тетрациклина је последица њихове способности да оксидују широк спектар супстрата, фенолних и нефенолних. Овај ензим у каталитичким реакцијама може да користи молекуларни кисеоник као крајњи акцептор електрона. Ипак, употреба слободних лаказа у индустријским и биотехнолошким процесима има одређене недостатке, као што су немогућност поновне употребе, ниска стабилност и висока осетљивост на денатуришуће реагенсе. Да би се

превазишла ова ограничења, развијене су различите технике имобилизације лаказа на многобројне синтетичке носаче. Међутим, многи од ових носача су скупи, што доводи до повећања укупних трошкова процеса.

У предложеној дисертацији истражена је могућност коришћења алтернативних материјала као носача за имобилизацију лаказа. У светлу актуелног нагласка на одрживим, зеленим методологијама у индустрији ензима, употреба агроиндустријског отпада као носача представља обећавајућу алтернативу. Агроиндустријски отпад карактерише висока порозност, велика површина и присуство различитих хемијских група, што га чини идеалним кандидатом носачем за имобилизацију ензима. Коришћењем ових отпадних материјала, индустрија ензима не само да смањује трошкове, већ доприноси искоришћењу пољопривредних нуспроизвода, промовишући одрживији приступ имобилизацији ензима.

Предмет истраживања ове докторске дисертације био је изолација и идентификација нових сојева гљива беле трулежи из букове шуме са Авале. Нови сојеви су тестирани као продуценти ензима из групе хидролаза и лаказе. Ензим лаказа је произведен на агроиндустријском лигноцелулозном отпаду помоћу најпотентнијих сојева и даље је испитана потенцијална примена слободне и имобилисане лаказе као биокатализатора у поступку биоразградње тетрациклина и азо боја текстиле индустрије, самостално и у комбинацији, поштујући принципе циркуларне економије и одрживог развоја.

Током израде ове докторске дисертације, изоловано је пет нових сојева гљива беле трулежи (*Bjerkandera adusta* TMF1, *Fomes fomentarius* TMF2, *Schizophyllum commune* TMF3, *Corioloropsis trogii* 2SMKN, и *Ganoderma resinaceum* NMKSS), који су молекуларно идентификовани на основу секвенце филогенетског маркера за идентификацију гљива, а затим је окарактерисан њихов потенцијал за производњу хидролаза и лаказа.

Утврђено је да два најпотентнија соја, *C. trogii* 2SMKN и *G. resinaceum* NMKSS, производе лаказе највише активности при ферментацији отпадног пивског јечма у кратком времену култивације. Значај добијених резултата огледа се у доказаној могућности производње лаказа високе активности на већ коришћеном агроиндустријском лигноцелулозном отпаду који се у огромним количинама одлаже у животну средину.

Такође, утврђено је да произведене слободне лаказе из *C. trogii* 2SMKN имају изузетну ефикасност у биоразградњи азо боја, појединачно и у њиховим смешама, у одсуству токсичних синтетичких редокс медијатора и у широком опсегу радних температура, што овај биокатализатор чини идеалним кандидатом за примену у реалним системима, као што су текстилни ефлуенти. С друге стране, лаказе из *G. resinaceum* NMKSS су се показале као добар кандидат за уклањање тетрациклина из отпадних вода на нижој радној температури (30°C) и у одсуству токсичних редокс медијатора.

Отпадни пивски јечам је након производње лаказа гајењем *C. trogii* 2SMKN успешно коришћен за имобилизацију произведених лаказа, чиме је отпад додатно рециклиран, смањујући агроиндустријски лигноцелулозни отпад и промовишући синтезу еколошки прихватљивог биокатализатора са добрим каталитичким перформансама, у складу са принципима циркуларне економије и одрживог развоја. Додатно, отпадне љуске кикирикија су успешно коришћене за имобилизацију лаказа из *G. resinaceum* NMKSS. Значај добијених резултата огледа се у проналажењу еколошки прихватљивих носача који се могу користити као алтернатива скупим, комерцијалним носачима у имобилизацији ензима, што може значајно утицати на цену крајњег производа.

Синтетисани еколошки прихватљиви биокатализатори су показали високу ефикасност у поступцима биоразградње азо боја текстилне индустрије (имобилисана лаказа из *C. trogii* 2SMKN на рециклираном отпадном пивском јечму) и тетрациклина (имобилисана лаказа из *G. resinaceum* NMKSS на отпадним љускама кикирикија), са могућношћу вишекратне употребе у неколико радних циклуса. Значај добијених резултата се огледа у синтези нових биокатализатора добрих каталитичких перформанси, који се могу вишекратно применити у одређеним биотехнолошким процесима, чиме се додатно може уштедети енергија и смањити материјални трошкови.

На крају, још једним поступком рециклирања отпадног пивског јечма након примене имобилисаних система у разградњи азо боја, у новом поступку имобилизације лаказе из *C. trogii* 2SMKN су испоштовани принципи циркуларне економије и одрживог развоја, уз поновну синтезу еколошки прихватљивог биокатализатора добрих каталитичких својстава који може имати исту или сличну вишеструку примену.

На основу опсежног прегледа литературе, може се закључити да се истраживања у оквиру ове докторске дисертације уклапају у светске трендове и указују на значај и актуелност проучаване проблематике.

3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

У оквиру ове докторске дисертације цитирано је 272 литературна навода који указују на актуелна истраживања у испитиваној области, а већина референци представља научне радове објављене у врхунским међународним часописима у последњој деценији. Истраживања приказана у наведеним референцама су коришћена за планирање експерименталног рада, анализу и тумачење резултата добијених током израде докторске дисертације. Такође, међу литературним наводима се налазе уџбеници и прегледни радови, који представљају базична сазнања из области од интереса и полазну основу за тумачење добијених експерименталних резултата.

3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

План истраживања у оквиру докторске дисертације је остварен коришћењем одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и обрадом података.

У овој докторској дисертацији, са дрвета букве (*Fagus sylvatica*) из букове шуме на Авали, изоловано је пет нових сојева гљива беле трулежи. Примарна идентификација је извршена на основу морфолошких карактеристика, а затим је извршена молекуларна идентификација свих пет сојева на основу секвенци ITS (енг. Internal Transcribed Spacer) региона, који је у литератури препознат као филогенетски маркер за идентификацију гљива. Нови сојеви су на основу добијених резултата идентификовани као *B. adusta* TMF1, *F. fomentarius* TMF2, *S. commune* TMF3, *C. trogii* 2SMKN и *G. resinaceum* NMKSS. Карактеризација ензимског потенцијала, лаказног и хидролитичког је извршена квалитативном методом на селективним агарним подлогама које су садржале одређени супстрат, семи-квантитативном методом (API ZYM тест) и квантитативном методом која је подразумевала одређивање ензимске активности екстрацелуларног екстракта добијеног након гајења гљива на четири различита агроиндустријска лигноцелулозна супстрата (отпадна кафа, отпадни пивски јечам, сојина и сунцокретова сачма).

Два најпотентнија соја *C. trogii* 2SMKN и *G. resinaceum* NMKSS су искоришћена у поступку производње лаказа гајењем на отпадном пивском јечму. Карактеризација произведених лаказа (испитивање молекулске масе, рН и температурног оптимума, стабилности лаказе, као и испитивање утицаја различитих металних катјона на активност лаказе) је извршена поређењем активности у различитим условима. Активност лаказе одрежена је спектрофотометријском методом оксидацијом фенолног супстрата, гвајакола, и анализом апсорбанце на таласној дужини од 470 nm.

Лаказа два најпотентнија соја је концентрована и пречишћена из екстрацелуларног екстракта. Произведена слободна лаказа из *C. trogii* 2SMKN је примењена у поступку биоразградње азо боја текстилне индустрије (*Orange G*, *Congo Red* и *Eriochrome Black T*) и њихове смеше. Слободна лаказа из *G. resinaceum* NMKSS је примењена у биоразградњи тетрациклина из отпадних вода. Ефикасност биоразградње је испитана у лабораторијским условима, и оптимизована одабиром кључних параметара (рН, температура, време,

концентрација ензима и боја, односно тетрациклина). Праћење процеса обезбојавања је вршено спектрофотометријском методом анализом промене апсорбанце на максималној таласној дужини карактеристичној за сваку испитивану азо боју и смешу азо боја. Додатно, карактеризација производа биоразградње сваке азо боје је извршена инструменталним методама (HPLC, GC-MS, LC-MS), док је карактеризација производа биоразградње смеше азо боја извршена HPLC методом. Утицај боја и производа њихове биоразградње на биљке, као и микроорганизме је испитан *in vitro* тестом фитотоксичности на економски и пољопривредно важну културу, пшеницу (*Triticum aestivum*), док је тестом антимицробне активности испитан њихов утицај на три биотехнолошки важна микроорганизма (*C. albicans* ATCC 10259, *L. rhamnosus* ATCC 7469 и *S. cerevisiae*).

Производи биоразградње тетрациклина, амрацина и довицина, су окарактерисани HPLC методом, која је коришћена и у поступку оптимизације биоразградње ових антибиотика слободном лаказом из *G. resinaceum* NMKSS. Такође, карактеризација тетрациклина и производа њихове биоразградње је извршена тестом антимицробне активности *in vitro* на два патогена микроорганизма, Грам негативну бактерију, *Escherichia coli* и Грам позитивну бактерију, *Staphylococcus aureus*, припремом серије разблажења у стерилном физиолошком раствору.

У поступку имобилизације лаказе из *C. trogii* 2SMKN на рециклирани отпадни пивски јечам, претходно коришћен у поступку производње лаказе, прво је извршена активација носача киселинско-базним третманом као и увођење амино групе третманом 5-аминосалицилном киселином. Након тога је испитан утицај основних параметара имобилизације, рН, времена имобилизације и концентрације понуђених протеина на ефикасност имобилизације, односно принос имобилизације и специфичну активност имобилисане лаказе. Са друге стране, у случају имобилизације лаказе из *G. resinaceum* NMKSS на отпадне љуске кикирикија, у циљу функционализације носача, прво је извршено одмашћивање носача у етанолу по стандардној методи у Сокслетовом ексикатору, након чега је по истом претходно описаном протоколу настављена даља активација носача. Активност имобилисане лаказе у оба случаја је одређена спектрофотометријском методом, мерењем оксидације гвајакола имобилисаним ензимом, док је концентрација протеина одређена стандардном методом по Лорију. Карактеризација носача пре и након предtretmana за активацију је извршена SEM и FT-IR анализом, док је успешност имобилизације потврђена такође стандардном FT-IR анализом.

Могућност вишекратне употребе имобилисане лаказе из *C. trogii* 2SMKN у поступку биоразградње азо боја је испитана кроз реакционе циклусе при претходно утврђеним оптималним условима за сваку азо боју, појединачно и њихову смешу. Промена интензитета обојености је праћена спектрофотометријском методом мерењем апсорбанци на максималној таласној дужини карактеристичној за сваку азо боју и смешу, у сваком циклусу обезбојавања. Са друге стране, могућност вишекратне употребе имобилисане лаказе из *G. resinaceum* NMKSS у поступку биоразградње тетрациклина је испитана HPLC методом.

На крају, могућност поновне имобилизације лаказе из *C. trogii* 2SMKN на већ коришћеном отпадном пивском јечму у поступку имобилизације лаказе и биоразградње азо боја и њихове смеше имобилисаном лаказом, је испитана оптимизованом методом имобилизације овог ензима, а могућност поновне употребе имобилисаног система је испитана у новом поступку биоразградње три азо боје (*Orange G*, *Congo Red* и *Eriochrome Black T*) кроз реакционе циклусе.

3.4. Применљивост остварених резултата

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације пружају научну основу за примену новоизолованих сојева гљива беле трулежи, *C. trogii* 2SMKN и *G. resinaceum* NMKSS, у производњи ензима лаказе са одличним каталитичким перформансама, узгајањем на јефтиним агроиндустријском лигноцелулозном отпаду. Овај приступ истовремено доприноси индустрији ензима и заштити животне средине, с обзиром на све већу потребу за

јефтином производњом ензима високе активности и стабилности, као и на значај смањења акумулације агроиндустријског отпада у животној средини.

У дисертацији је утврђено да лаказе произведене помоћу гљива беле трулежи показују изузетну ефикасност у биоразградњи азо боја које се налазе у отпадним водама текстилне индустрије и тетрациклина. Висок степен биоразградње ових ксенобиотика постигнут је без употребе токсичних синтетичких редокс медијатора, што лаказе чини еколошки прихватљивим решењем за уклањање загађујућих супстанци из отпадних вода. Осим тога, способност лаказа да постижу висок степен обезбојавања азо боја у широком опсегу рН и температуре чини их идеалним кандидатима за примену у реалним индустријским системима. Такође, добијени резултати у дисертацији јасно указују на већу ефикасност нове делимично пречишћене лаказе из *C. trogii* 2SMKN у биоразградњи азо боја и њихове смеше у односу на комерцијалну лаказу из *Aspergillus* sp.

Истраживање је такође показало да агроиндустријски лигноцелулозни отпад, осим што служи као супстрат за производњу ензима, може бити ефикасан носач за њихову имобилизацију, захваљујући својим својствима као што су висока порозност, велика специфична површина и присуство различитих функционалних група. Употреба овог отпада као носача представља значајну алтернативу комерцијалним, скупим и тешко доступним носачима, што је у складу са трендовима одрживих и зелених стратегија у индустрији ензима.

Резултати ове докторске дисертације показали су и да имобилисане лаказе одликује могућност високо ефикасне вишекратне примене, кроз неколико реакционих циклуса у поступцима биоразградње азо боја, њихове смеше и тетрациклина. Могућност вишекратне примене имобилисане лаказе у поступцима биоразградње их чини пожељним кандидатом за примену у реалним системима, с обзиром да смањује трошкове биоразградње, за коју се неретко издвајају минимална финансијска средства.

3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

У свом досадашњем истраживачком раду, кандидат Невена Илић, мастер инжењер технологије, показала је самосталност и стручност у претраживању литературе, припреми и реализацији експеримената, коришћењем различитих метода карактеризације, анализе и обраде резултата. На основу досадашњих залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

4.1. Приказ остварених научних доприноса

Резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације имају вишеструко значајан научни, али и практичан допринос, при чему се може издвојити следеће:

- Успешно је извршена изолација и молекуларна идентификација пет нових сојева гљива беле трулежи из групе *Basidiomycetes*: *Bjerkandera adusta* TMF1, *Fomes fomentarius* TMF2, *Schizophyllum commune* TMF3, *Corioloopsis trogii* 2SMKN, *Ganoderma resinaceum* NMKSS, а квалитативном, семи-квантитативном и квантитативном анализом потврђен изузетан ензимски потенцијал свих пет сојева
- Гајењем два соја, *C. trogii* 2SMKN и *G. resinaceum* NMKSS, на агроиндустријском лигноцелулозном отпаду, отпадном пивском јечму, произведена је сирова лаказа добрих каталитичких перформанси
- Слободна, делимично пречишћена лаказа из *C. trogii* 2SMKN је показала високу ефикасност у поступку биоразградње три азо боје, две моноазо (*Orange G* и

Eriochrome Black T) и једне диазо боје (*Congo Red*), појединачно, као и њихове смеше, у одсуству токсичних редокс медијатора лаказе, при широком температурном и рН опсегу, док је слободна, делмично пречишћена лаказа из *G. resinaceum* NMKSS показала високу ефикасност у уклањању два тетрациклина, амрацина и довицина на 30 °C и рН 5, у одсуству токсичних редокс медијатора лаказе

- Агроиндустријски лигноцелулозни отпад се показао као добар носач за имобилизацију лаказе чиме је омогућена синтеза еколошки прихватљивог биокатализатора са могућношћу вишекратне употребе у биоразградњи ксенобиотика
- Имобилицане лаказе на агроиндустријском лигноцелулозном отпаду, тј. еколошки прихватљиви биокатализатори су показали могућност вишекратне примене у поступцима биоразградње ксенобиотика кроз неколико реакционих циклуса

4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Резултати добијени у овом истраживању показују значајан напредак у примени лаказа за биоразградњу азо боја и тетрациклина, што је од значаја за заштиту животне средине. Употреба агроиндустријског отпада као супстрата и носача за имобилизацију ензима показала је обећавајуће резултате, који се надовезују на трендове у савременој науци усмерене ка одрживим решењима. У поређењу са претходним истраживањима која су се такође бавила имобилизацијом лаказа, истраживање у овој докторској дисертацији показује да се агроиндустријски отпад може успешно користити као и за производњу ензима и као носач за имобилизацију ензима, чиме се доприноси циркуларној економији. Овај приступ је у складу са трендовима у истраживањима одрживих материјала, где се посебна пажња посвећује коришћењу отпадних материјала у новим апликацијама. У поређењу са сличним студијама, ова истраживања показују конкурентску предност у погледу стабилности и ефикасности добијених биокатализатора у различитим рН и температурним условима. Ова карактеристика чини их погодним за примену у различитим индустријским условима, што је значајан допринос у односу на претходна истраживања која су показала одређена ограничења у примени. Међутим, у светлу других студија које су истраживале употребу различитих носача за имобилизацију ензима, остаје простор за даље испитивање потенцијала агроиндустријског отпада као носача. На пример, неке студије су показале изузетну стабилност ензима на синтетичким носачима, што поставља питање дугорочне стабилности и економске исплативости природних носача у реалним индустријским условима. Даља истраживања би могла укључити компаративне анализе различитих носача, како би се прецизније утврдила предност агроиндустријских материјала у односу на синтетичке. Поред тога, док је ово истраживање показало високу ефикасност у биоразградњи азо боја и тетрациклина, неке друге студије су истраживале примену лаказа у биоразградњи других загађујућих супстанци, као што су полициклични ароматични угљоводоници и сложен фармацевтски отпад. У том контексту, ово истраживање представља солидну основу, али би даља истраживања могла истражити шире примене лаказа у уклањању других врста загађујућих материја. На крају, важно је напоменути да, док су резултати ове докторске дисертације веома охрабрујући, неке студије су показале ограничења у примени ензима у великим размерама због проблема као што су инхибиција ензима у реалним сложеним системима а ограничење могу бити трошкови производње, који нису анализирани у оквиру ове дисертације. Ова питања указују на потребу за додатним истраживањима која би укључивала оптимизацију процеса и процену економске исплативости у различитим индустријским контекстима.

4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Невена Илић је своје резултате потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја као и саопштавањем радова на међународним научним скуповима. У оквиру израде докторске дисертације кандидат је први аутор три рада објављена у врхунском

међународном часопису (M21), једног рада у часопису од међународног значаја (M23), и шест саопштења на скуповима међународног значаја (четири категорије M33 и два категорије M34).

Категорија M21:

1. **Илић, N.**, Filipović Tričković J., Milić M., Mihajlovski, K. Harnessing the hidden environmental power of *Bjerkandera adusta* laccase: Sustainable production, green immobilization, and ecofriendly decolorization of mixed azo dyes, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 42, 101747, 2024 (**IF=5,5**) (**ISSN:2352-5541**). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101747>
2. **Илић, N.**, Davidović, S., Milić, M., Lađarević, J., Onjia, A., Dimitrijević-Branković, S., Mihajlovski, K. Green biocatalyst for decolorization of azo dyes from industrial wastewater: *Corioloopsis trogii* 2SMKN laccase immobilized on recycled brewer's spent grain, *Environmental Science and Pollution Research*, vol.31, pp. 32072-32090, 2024 (**IF=5,4**) (**ISSN:0944-1344**). <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33367-x>
3. **Илић N.**, Davidović S., Milić M., Rajilić-Stojanović M., Pecarski D., Ivančić-Šantek M., Mihajlovski K. and Dimitrijević-Branković S., Valorization of lignocellulosic waste for extracellular enzyme production by novel Basidiomycetes: screening, hydrolysis, and bioethanol production, *Biomass Conversion and Biorefinery*, vol.13, pp. 17175-17186, 2022, (**IF=4,987**) (**ISSN: 2190-6815**; Engineering, Chemicals 31/143), <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02145-x>

Категорија M23:

1. **Илић, N.**, Milić, M., Beluhan, S., Dimitrijević-Branković, S., Cellulases: From lignocellulosic biomass to improved production, *Energies*, 16(8),3598-, 2023, (**IF=3**) (**ISSN: 1996-1073**). <https://doi.org/10.3390/en16083598>

Категорија M33

1. **Илић, N.**, Milić, M., Davidović, S., Dimitrijević-Branković, S., Mihajlovski, K. Application of crude fungal laccase from *Ganoderma* spp. in decolorization of triphenylmethane dye crystal violet, *Proceedings*, p. 179-186, VIII International Congress "Engineering, Environment and Materials in Process Industry", EEM2023, March 20-23 2023, Jahorina, Bosnia and Herzegovina (**ISBN: 978-99955-81-45-9**)
2. **Илић, N.**, Davidović, S., Miljković, M., Radovanović, N., Dimitrijević-Branković, S., Mihajlovski, K. Immobilization of crude fungal laccase from *Ganoderma* spp. on modified titanium dioxide nanoparticles, *Proceedings*, pp. 187-196, VIII International Congress "Engineering, Environment and Materials in Process Industry", EEM2023, March 20-23, 2023, Jahorina, Bosnia and Herzegovina (**ISBN: 978-99955-81-45-9**)
3. **Илић, N. V.**, Lazić, V., Radovanović, N. R., Mihajlovski, K. R., Davidović, S. Z., Miljković, M. G. Investigation of the influence of different nanoparticles on the growth of soil microorganisms and organic mung bean, *Proceedings*, pp. 451-460, VII International Congress "Engineering, Environment and Materials in Process Industry", March 17-19, 2021, Jahorina, Bosnia and Herzegovina (**ISBN: 978-99955-81-40-4**)
4. **Илић, N. V.**, Kukučka, A. M., Milić, M. D., Milutinović, M. D., Miljković, M. G., Davidović, S. Z. Synthesis and characterization of agar-agar-chitosan composite films incorporated with green synthesized silver nanoparticles, *Proceedings*, pp. 461-469, VII International Congress "Engineering, Environment and Materials in Process Industry", March 17-19, 2021, Jahorina, Bosnia and Herzegovina (**ISBN: 978-99955-81-40-4**)

Категорија М34

1. **Илић, Н. В.**, Milić, M. D., Davidović, S. Z., Mihajlovski, K. R., Dimitrijević-Branković, S. I. The evaluation of the antioxidant potential during the oxidative polymerization of polyphenol compounds induced by laccase enzyme. *Book of Abstracts*, pp.158. The 2ndUnifood International Conference-UNIFood Conference 2021, September 24-25, 2021, University of Belgrade, Belgrade, Serbia (**ISBN: 978-86-7522-066-4**)
2. **Илић, Н.**, Milić, M., Davidović, S., Kostić, A., Mihajlovski, K., Dimitrijević-Branković, S., Decolorization of azo dye Methyl Orange with crude fungal laccase obtained by growing *Ganoderma* spp. on cereal mix, *20th Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering, Programme and Book of Abstracts*, pp. 80. November 30-December 2, 2022, Belgrade, Serbia (**ISBN: 978-86-80321-37-0**)

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација под називом „**Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре**“ представља значајан научни допринос у области биотехнологије и заштите животне средине. У овом истраживању, кандидат Невена Илић, мастер инжењер технологије, успешно је показала могућност коришћења агроиндустријског отпада као супстрата за производњу и носача за имобилизацију ензима лаказа, што је основа за развој ефикасних и економски исплативих биокатализатора за биоразградњу токсичних ксенобиотика. На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација кандидата Невене Илић, под насловом „**Производња лаказа гљивама беле трулежи на агроиндустријском отпаду и њихова примена у поступцима разградње ксенобиотика фенолне структуре**“, прихвати и изложи на увид јавности, те да се упути на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду, у складу са одредбама Закона о високом образовању и Правилником о докторским студијама Универзитета у Београду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Др Дејан Безбрадица, редовни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Анета Бунтић, виши научни сарадник
Институт за земљиште Београд

.....
Др Снежана Димитријевић, научни сарадник
Институт за повртарство Смедеревска Паланка