

Наставно-научном већу

Хемијског факултета

Универзитета у Београду

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.06.2019. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер биохемичара, Јоване Трбојевић Ивић, под насловом:

„Нови аспекти употребе хидроксиапатита као носача за имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза – дизајн, испитивање механизма везивања, стабилност, примена и значај“.

Веће научних области природних наука је на редовној седници, одржаној 24.11.2016. године, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (број одлуке: 61206-5960/2-16).

Поднету дисертацију смо прегледали и подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Јоване Трбојевић Ивић написана је на 179 страна А4 формата, прореда 1,5. Садржи 48 слика (15 у Општем делу, 26 у Нашим радовима и 7 у Прилогу) и 19 табела (2 у Општем делу, 5 у Нашим радовима и 12 у Експерименталном делу). Рад обухвата следећа поглавља: 1. Увод (1 страна); 2. Општи део (48 страна); 3. Наши радови (60 страна); 4. Експериментални део (33 стране); 5. Литература (7 страна, 293 литературна навода); 6. Прилози (7 страна). Поред наведеног, дисертација садржи и: насловну страну на српском и енглеском језику (укупно 2 стране), извод на српском и енглеском језику (укупно 4 стране), захвалницу (2 стране), садржај (5 страна), списак скраћеница (3 стране), биографију и библиографију кандидата (1 страна) и изјаве докторанда о ауторству, о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и о коришћењу (укупно 3 стране).

Увод представља сажет осврт на област истраживања, актуелност теме у научној заједници и циљеве докторске дисертације. Посебно је истакнут значај липаза и гликозидаза у савременим индустријским биотрансформацијама, пре свега у синтетским реакцијама у неводеним реакционим системима. Укратко је дат и преглед основних метода стабилизације ензима у неводеним реакционим системима, са посебним акцентом на имобилизацији као најзаступљенијој методи. Главни циљ докторске дисертације је био да се испита могућност примене хидроксиапатита (НАР), лако доступног,

биокомпатибилног, биодеградабилног и еколошки прихватљивог носача за имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозида ради њихове стабилизације и примене у различитим индустријски значајним синтезама.

Општи део обухвата неколико целина. Прво су детаљано представљени структура, реакциони механизам и индустријска примена ензима који су били у фокусу ове докторске дисертације: липазе из *Candida rugosa* (CRL), *Candida antarctica* (CAL A, CAL B), *Pseudomonas cepacia* (PCL) и панкреаса свиње (PPL), као и β -глукозидазе из бадема, α -глукозидазе (малтазе) и β -фруктофуранозидазе (инвертазе) из *Saccharomyces cerevisiae* и β -галактозидазе (лактазе) из *Aspergillus oryzae* (AOL). Синтетска примена липаза је представљена на примерима синтезе капсиноида и мирисних естара, док је синтетски значај гликозидаза представљен на примерима синтезе галактозида ванилил-алкохола и галакто-олигосахаридних пробиотика (GOS). У другој целини су детаљније сагледани стабилност и примена липаза и гликозидаза у најчешће коришћеним неводним реакционим системима: органским растварачима, јонским течностима, суперкритичним течностима и реверзним мицелама. Затим су описане основне стратегије за стабилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза. Имобилизација, као најсвеобухватнија метода стабилизације ензима за примену у индустријским трансформацијама, је детаљно описана. Посебну целину унутар овог поглавља чини приказ структуре НАР, механизма везивања протеина за овај носач и његовог значаја у имобилизацији протеина са индустријском и биомедицинском применом. На крају поглавља задати су циљеви ове докторске дисертације.

Наши радови представљају приказ и дискусију најзначајнијих резултата ове докторске дисертације. Поглавље је тематски подељено у 5 целина. У првој целини је испитана могућност примене НАР као носача за имобилизацију липаза и гликозида. Из сваке групе је одабран ензим, који се најбоље везује за НАР, а затим су оптимизовани остали реакциони параметри за њихову имобилизацију. Друга целина обухвата проучавање механизма интеракција између имобилизованих ензима (CRL и AOL) и НАР. Имобилизати су морфолошки окарактерисани скенирајућим електронским микроскопом, испитано је у којим условима се елуирају са носача и идентификоване су аминокиселинске секвенце, преко којих интерагују са НАР. У трећој целини је испитан ефекат имобилизације на стабилност CRL и AOL на повишеним температурама и у присуству органских растварача. Четврта целина тиче се примене CRL и AOL имобилизованих на НАР у неводним реакционим системима. Каталитичка ефикасност имобилизованих ензима је евалуирана током синтезе капсиноида и метил-етаноата, применом CRL имобилизоване на НАР (CRL-НАР), односно током синтезе ванилил-галактозида и GOS применом AOL имобилизоване на НАР (AOL-НАР). Структурном карактеризацијом производа испитана је супстратна специфичност ензима имобилизованих на НАР. Последња, пета целина, представља закључке ове докторске дисертације, који сумирају најзначајније резултате из овог поглавља.

Експериментални део представља детаљан опис опреме, реагенаса, узорака и експерименталних процедура, коришћених у овој докторској дисертацији.

Литература сумира релевантне радове из научне области, којој припада ова докторска дисертација.

Прилози садрже масене и NMR спектре производа добијених применом ензима имобилизованих на НАР из ове докторске дисертације.

Б. Кратак приказ резултата

Потенцијал НАР, као носача за имобилизацију индустријски значајних хидролитичких ензима, је испитан на примеру 4 липазе и 4 гликозидазе различитог порекла, структуре и супстратне специфичности. Међу тестираним ензимима, за НАР се најефикасније везују CRL и AOL. У оптималним условима, оба ензима се готово квантитативно адсорбују на НАР (након 30 минута инкубације више од 95 % ензимске активности се везује за носач) са приносом активности имобилизованих ензима преко 50%. Оба ензима се за НАР адсорбују по механизму метал-координативне везе. Хидроксиапатит-везујућа секвенца код CRL и AOL се састоји из површинског кластера од око 10 киселих аминокиселинских остатака Asp и Glu и карбоксилних група на C-терминусу.

Имобилизација на НАР је допринела значајној стабилизацији CRL у органским растварачима, метанолу и *n*-хексану. Посебно је упечатљива стабилност имобилизоване CRL у метанолу: након трочасовне инкубације CRL-НАР задржава 50 % своје почетне активности, док се слободан ензим у истим условима потпуно инактивира. У *n*-хексану CRL-НАР задржава 35 % почетне активности након трочасовне инкубације. У случају AOL, имобилизација на НАР је поспешила стабилност ензима на температурама преко 50°C: након трочасовне инкубације на 55 °C AOL-НАР задржава 2 пута већу активност него слободан ензим, док је на 75 °C након трочасовне инкубације активност имобилизоване AOL била 8 пута већа, него код слободног ензима.

Применом CRL у слободном и имобилизованом облику су у реакцијама естерификације и трансестерификације добијене 2 значајне групе производа: нутрацеутици капсиноиди и мирисни метил-естри карбоксилних киселина. У обе реакције је уочено да имобилизација на НАР узрокује промену супстратне специфичности CRL ка ацил-донорима са краћим ланцем. У случају капсиноида слободна CRL у највишем приносу синтетише ванилил-естар лауринске киселине (C12:0), док CRL-НАР у највишем приносу синтетише ванилил-естар октанске киселине (C8:0). У случају метил-естара, слободна CRL у највишем приносу синтетише метил-естар бутанске киселине, за разлику од CRL-НАР, која у највишем приносу синтетише метил-естар етанске киселине. Трансестерификацијом кокосовог уља ванилил-алкохолу у присуству слободне CRL је

ово популарно прехранбено уље обogaћено смешом 3 капсиноида: ванилил-октаноата, ванилил-деcanoата и ванилил-лаурата.

Каталитичка ефикасност имобилизованог препарата AOL је испитана током трансгалактозилације ванилил-алкохола и лактозе, при чему су добијене 2 групе производа: антиоксиданс ванилил-галактозид и пробиотици GOS. Током синтезе GOS, од посебне важности је била раније уочена температурна стабилност AOL-HAP на 55 °C, јер је извођење реакције на овој температури омогућило коришћење концентрованијег раствора лактозе, што је позитивно утицало на принос галакто-олигосахарида.

Структурном анализом деривата ванилил-алкохола, синтетисаних каталитичким дејством CRL-HAP и AOL-HAP, потврђено је да оба имобилизата током синтетских реакција у неводеној средини модификују ванилил-алкохол искључиво преко примарне хидроксилне (бензилне) групе.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Принос имобилизације CRL и AOL на HAP је био значајно виши у поређењу са њиховом адсорпцијом на друге носаче, познате из литературе: хитозан, бентонит, оксиде метала и Duolit. Имајући у виду значај интеракција протеина и HAP и са фундаменталног и са примењеног аспекта, по први пут у литератури су идентификоване и описане HAP-везујуће секвенце на CRL и AOL, што доприноси бољем разумевању особина имобилизованих ензимских препарата из ове докторске дисертације.

Висока стабилност CRL-HAP у метанолу је један од најважнијих резултата ове докторске дисертације, јер је у литератури добро документовано да метанол снажно инхибира најзначајније индустријске липазе, CRL и CAL B. Управо је на овом резултату била базирана синтеза метил-етаноата, естра од значаја за прехранбену и козметичку индустрију и тако је, први пут у литератури, показано да се овај важан индустријски производ може синтетисати и ензимском катализом. На тај начин је отворена могућност даљег развоја ове технологије, која је еколошки знатно прихватљивија него тренутно актуелна хемијска синтеза.

Капсиноиди су физиолошки активни естри ванилил-алкохола и масних киселина различите дужине и засићености алкил-низа. Они су структурни и функционални аналози капсаицина, једног од најпознатијих нутрацеутика. Применом слободне CRL и CRL-HAP је синтетисана серија капсиноида различите дужине ацил-донора, са приносом готово 80%, значајно већим у поређењу са претходно објављеним приносима капсиноида са слободном CRL и Novozyme 435 (комерцијални имобилизовани препарат CAL B, произвођача Novo Nordisk). Висок принос капсиноида у овој докторској дисертацији потврђује да је *n*-хексан, у коме је изведена естерификација ванилил-алкохола, повољнији реакциони систем него поларни органски растварачи, чија је примена описана у литератури. Високи приноси естерификације ванилил-алкохола истовремено показују да

је CRL добра алтернатива CAL B, чији су имобилизовани препарати комерцијално доступни и често се користе у различитим синтезама, али им је цена висока. Поред слободних масних киселина, кокосово уље се такође показало као добар супстрат за синтезу капсиноида у реакцији трансестерификације са слободном CRL. Тиме је показано да се CRL може користити и за производњу функционалне хране, обогаћивањем овог популарног прехранбеног уља капсиноидима.

Ванилил-галактозид је антиоксиданс, чије је механизам дејства сличан резвератролу и изофлавоноидима. Такође је важан и као градивни елемент сложенијих једињења: галактоконјугата, фенил-пропаноидних гликозида и гликокластера. Каталитичка ефикасност AOL-HAP у синтези овог једињења је била слична ефикасности лактазе из *Kluyveromyces lactis* (принос ванилил-галактозида са AOL-HAP је 20 %, а са лактазом из *Kluyveromyces lactis* је око 30 %). Премда је *Kluyveromyces lactis* један од најзначајнијих извора лактазе у прехранбеној индустрији, AOL је као екстрацелуларни ензим са већом температурном стабилношћу и широм супстратном специфичношћу одабрана за истраживање у овој докторској дисертацији. Принос GOS од 65 g/L, описан у овој докторској дисертацији, је био значајно виши него у реакцији са AOL ковалентно имобилизованом на хитозан (45 g/L) и врло сличан приносу GOS са AOL енкапсулираном у гелове од поливинил-алкохола (70 g/L). Температурна стабилност AOL-HAP омогућила је извођење реакције на 55 °C, што је за узврат омогућило примену концентрованијег раствора лактозе и томе се може приписати висок остварени принос синтезе GOS.

Структурна карактеризација ванилил-лаурата и ванилил-галактозида је показала да CRL и AOL имају идентичну преференцију током естерификације и трансгалактозилације према примарној хидроксилној (бензилној) групи овог алкохола. Уочена супстратна специфичност је добро документована и за друге липазе и гликозидазе током реакција са ванилил-алкохолем и њему сличним једињењима.

Г. Објављени радови и саопштења која чине део дисертације

Из ове докторске дисертације проистекла су укупно 3 научна рада (2 из категорије M21a, 1 из категорије M21) и 3 саопштења са скупова националног значаја, штампана у целини (категорија M64).

- **Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a)**

1. Trbojevic Ivic J, Milosavic N, Dimitrijevic A, Gavrovic Jankulovic M, Bezbradica D, Kolarski D, Velickovic D. Synthesis of medium-chain length capsinoids from coconut oil catalyzed by *Candida rugosa* lipases. Food Chemistry, 2017; 218: 505.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616314340?via%3Dihub>

2. Trbojevic Ivic J, Velickovic D, Dimitrijevic A, Bezbradica D, Dragacevic V, Gavrovic Jankulovic M, Milosavic N. Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry. Journal of the Science of Food and agriculture, 2016; 96 (12): 4281.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.7641>
- **Радови објављени у врхунским међународним часописима (M21)**
 1. Trbojevic Ivic J, Dimitrijevic A, Milosavic N, Bezbradica D, Drakulic BJ, Gavrovic Jankulovic M, Pavlovic M, Rogniaux H, Velickovic D. Assessment of the interacting mechanism between *Candida rugosa* lipases and and hydroxyapatite and identification of hydroxyapatite-binding sequence through proteomics and molecular modelling. RSC Advances, 2016; 6: 34818.
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/RA/C6RA07521E#!divAbstract>
 - **Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64)**
 1. Dragacevic V, Trbojevic Ivic J, Mutic J, Bezbradica D. Optimizacija proizvodnje i analitika biodizela iz dobijenog katalitičkom aktivnošću lipaze B *Candidae antarcticae*. III Konferencija mladih hemičara Srbije. Beograd, 24. Oktobar 2015. BBP09, Zbornik radova, str. 68.
 2. Trbojevic Ivic J, Dragacevic V, Dimitrijevic A, Gavrovic Jankulovic M. Lipaze iz *Candida rugosa* imobilizovane na hidroksiapatitu: stabilan biokatalizator sa velikim industrijskim potencijalom. III Konferencija mladih hemičara Srbije. Beograd, 24. Oktobar 2015. BBP09, Zbornik radova, str. 69.
 3. Trbojevic Ivic J, Velickovic D, Dimitrijevic A, Bezbradica D, Gavrovic Jankulovic M, Milosavic N. Stabilizacija lipaza iz *Candida rugosa* jednostavnom i efikasnom imobilizacijom na hidroksiapatitu. 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva. Novi Sad, 29.-30. maj 2015. BTO2, Zbornik radova, str. 99.

Поред набројаних публикација и саопштења, кандидат је аутор на још 4 научна рада (1 у часопису категорије M21 и 3 у часописима категорије M23), 1 поглавља у књизи (категирија M13), 1 саопштења са међународног скупа штампаног у целини (категирија M33) и 3 саопштења са скупова националног значаја штампаних у изводу (категирија M64). Ове публикације су такође из биохемије и припадају ужој научној области из које је и докторска дисертација.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације кандидата Јоване Трбојевић Ивић је проверена у програму *iThenticate*, према Правилнику о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета

у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Степен подударности, одређен овим програмом износи 5%. Ова количина подударања текста је последица цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података везаних за тему докторске дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из ове докторске дисертације, што је у сагласности са чланом 9. горе поменутог Правилника.

Сходно томе, сматрамо да је докторска дисертација кандидата Јоване Трбојевић Ивић оригинална и да су поштована академска правила цитирања.

Б. Закључак

У докторској дисертацији, под насловом: „Нови аспекти употребе хидроксиапатита као носача за имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза – дизајн, испитивање механизма везивања, стабилност, примена и значај“, кандидат Јована Трбојевић Ивић је успешно одговорила на све постављене задатке који се односе на имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза на НАР, карактеризацију и примену добијених имобилизата. На НАР су једноставном и брзом методом физичке адсорпције у високом приносу имобилизоване липаза из *Candida rugosa* и лактаза из *Aspergillus oryzae*. Имобилизација на НАР је допринела стабилизацији ензима у присуству органских растварача и на температурама преко 50 °С, што је имплементирано у развој неводених реакционих система у којима је испитана каталитичка ефикасност имобилизованих ензима. Применом препарата CRL и AOL успешно су синтетисани алифатични и ароматични естри и галактозиди: капсиноиди (естри ванилил-алкохола и засићених масних киселина), метил-етаноат, ванилил-галактозид и GOS. Овим реакцијама је потврђено да препарати CRL и AOL из ове докторске дисертације имају потенцијал да се даље развијају као индустријски катализатори, јер су по каталитичкој ефикасности у рангу са хемијским катализаторима или комерцијалним имобилизованим биокатализаторима.

Научно-истраживачки рад кандидата је резултовао публикавањем 3 научна рада (2 из категорије M21a, а 1 из категорије M21) и 3 саопштења категорије M64, који су директно проистекли из докторске дисертације. Комисија је сагласна да резултати, приказани у поднетој докторској дисертацији, представљају значајан допринос у области биохемије, јер ближе описују механизам интеракција биокомпатибилног материјала какав је НАР и ензима и употпуњују фундаментална сазнања о значају ових интеракција. Представљено истраживање је такође значајно и са аспекта примењене ензимологије, јер указује на то како је правилним одабиром носача, ензима и реакционих услова осмишљен реакциони систем који може задовољити захтеве савремене индустрије.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију кандидата Јоване Трбојевић Ивић, под насловом „**Нови аспекти употребе хидроксиапатита као носача за имобилизацију индустријски значајних липаза и гликозидаза – дизајн, испитивање механизма везивања, стабилност, примена и значај**“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање звања доктор биохемијских наука.

Београд, _____ 10.09.2019. _____ Комисија

Др Марија Гавровић Јанкуловић

Редовни професор, Универзитет у Београду – Хемијски факултет; ментор

Др Зоран Вујчић

Редовни професор, Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Радивоје Продановић,

Ванредни професор, Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Љубодраг Вујисић,

Доцент, Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Дејан Безбрадица,

Редовни професор, Универзитет у Београду – Технолошко-металуршки факултет