

Универзитет у Београду- Хемијски факултет

Наставно-научно веће

Предмет: Извештај Комисије за преглед и оцену докторске дисертације Барбаре Јожеф, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа, Универзитета у Београду, одржаној 08.12.2016. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед и оцену докторске дисертације Барбаре Јожеф (рођена Јановић), мастер биохемичара, пријављене под насловом:

**„Примена растворних и имобилизованих изоформи пероксидазе из рена у
уклањању обојених ксенобиотика из отпадне воде“**

Након прегледа докторске дисертације, подносимо Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Барбаре Јожеф под наведеним насловом написана је на 145 страна А4 формата (проред 1,5), садржи 63 слике и 11 табела. Рад обухвата следећа поглавља: 1. Увод, 2. Општи део, 3. Наши радови, 4. Експериментални део, 5. Литература. Поред наведеног, дисертација садржи: *Извод на српском* (2 стране) и *енглеском језику* (2 стране), *Листу скраћеница* (2 стране), *Садржај* (4 стране), *Захвалницу* (1 страна), *Прилог* (10 страна), *Биографију кандидата*, *Изјаву о ауторству*, *Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада*, *Изјаву о коришћењу*.

У Уводу кандидат даје краћи осврт на област истраживања и тему свог рада.

У Општем делу дати су подаци о пероксидазама као и њихова класификација. Дат је детаљнији осврт о пероксидази из рена, описан је механизам њеног дејства, као и домени у примени третмана обојених ксенобиотика. Укратко су приказане методе имобилизације ове класе ензима са посебним нагласком у пољу примене третмана

обојене отпадне воде. Укратко су приказане класификације боја које су главни извори загађења индустријске отпадне воде. Дат је преглед могућих дејстава обојених ксенобиотика и метода које се примењују у циљу одређивања токсичности ових супстанци.

У *Нашим радовима* приказано је изоловање и пречишћавање изоформи пероксидазе из рена, дати су резултати испитивања ефикасности ових изоформи у обезбојавању двадесет и четири боје различитих структурних особина у зависности од рН раствора. Приказана је детаљна анализа обезбојавања четири модел-боје HPLC методом, као и идентификација главних производа обезбојавања једне модел-боје, оранж 2, киселом изоформом пероксидазе из рена LC—ESI-ToF-MS методом. Приказани су резултати синтезе десет имобилизата добијених применом киселе изоформе пероксидазе из рена, дати су резултати испитивања специфичне и деколоризационе активности, оптимизације концентрације боје и водоник-пероксида, стабилности према вишку водоник-пероксида, као и ефикасност у поновљеним циклусима обезбојавања. Приказани су резултати испитивања акутне токсичности боја пре и након обезбојавања са пероксидазом из рена применом теста на јединкама *Artemia salina*, као и резултати генотоксичности применом комет теста на BEAS-2B ћелијама. Дати су резултати испитивања интеракција боја и DNA и производа обезбојавања и DNA са сисарском и бактеријском плазмидном DNA.

У *Експерименталном делу* детаљно су описани реагенси и експерименталне процедуре коришћене у овој докторској дисертацији.

У *Закључку* су укратко сумирани резултати ове докторске дисертације.

Део *Литература* обухвата укупно 139 литературних навода. Као *Прилог* докторске дисертације дати су најважнији хемијски и еколошки закони на светском нивоу, структурни приказ испитиваних боја, LC—MS-ESI-ToF хроматограми и контролни експерименти комет теста. На крају дата је кратка биографија са библиографијом кандидата и неопходне изјаве.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

Обојени ксенобиотици су све више распрострањени у човековој околини због све веће продукције обојених материјала у текстилној и другим индустријама. Њихово

отпуштање у водотокове представља проблем модерног индустријског доба. С обзиром на то да већина обојених ксенобиотика поседује комплексну хемијску структуру, њихова деградација је изазован задатак. У оквиру ове докторске дисертације извршено је изоловање и пречишћавање киселих, неутралних и базних изоформи пероксидазе из рена и детаљно испитивање деколоризационе активности према широком спектру боја и рН. Изоловане изоформе показале су активност од 46,6 за киселе и 287,1 U/mL за базне изоформе пероксидазе из рена. У даљем раду коришћени су оптимизовани услови реакције обезбојавања (0,14 U/mL ензима, 0,44mM водоник-пероксида и концентрација боје која одговара 1 оптичкој јединици при максималној таласној дужини). Од 24 боје различитих структура највећи степен обезбојавања постигнут је применом киселе изоформе пероксидазе из рена (17 од 24 боје). На рН 5 обезбојено је 12 од 24 боје, док је на рН 9 обезбојено 10 боја. Анализа обезбојавања праћена је применом УВ видљиве спектрометрије. Применом течне хроматографије високог притиска потврђена је деградација испитиваних модел-боја. Главни производи обезбојавања једне модел-боје, оранж 2, применом киселе изоформе пероксидазе из рена, идентификовани су техником LC—ESI-ToF-MS.

У оквиру ове докторске дисертације урађена је синтеза и детаљно испитивање десет биокатализатора киселе пероксидазе из рена. Највећа специфична и деколоризациона активност постигнута је имобилизацијом киселе изоформе пероксидазе из рена на хитозану. Добијени имобилизати показали су већу стабилност према вишку водоник-пероксида у односу на растворни ензим. Показано је да овај имобилизат може да обезбојава и ниске и високе концентрације боје. Након седам оперативних циклуса његова деколоризациона активност опада за 35%.

Процена токсичности и генотоксичности боја пре и након обезбојавања испитана је применом теста акутне токсичности на јединкама *Artemia salina* и комет тестом на BEAS-2B ћелијама, респективно. Показано је да обезбојавањем долази до смањења процента морталитета јединки *Artemia salina* у односу на почетни раствор боја. Детектована су оштећења на молекулу DNA након 30-минутног третмана BEAS-2B ћелија бојом. Степен оштећења DNA износио је од 5 до 47% и зависио је од концентрације и типа боје. Даљим испитивањем две модел-боје детектована су оксидативна оштећења DNA. Након излагања ћелија производима обезбојавања поменути ефекти су значајно смањени. Извршена је детаљна анализа DNA интеракција две модел-боје и њихових производа обезбојавања са DNA из телећег тимуса и са

плазмидном DNA. Показано је постојање интеракција са DNA, које су значајно смањене након обезбојавања са киселом пероксидазом из рена. Ово је потврђено агарозном електрофорезом, где је уочено незнатно цепање плазмидне DNA. Из свега приложеног може се закључити да обезбојавање са пероксидазом из рена доводи до стварања значајно мање токсичних производа деградације.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Интензиван индустријски развој праћен је све већом комплексношћу састава отпадне воде. Синтетичке боје су данас у широкој примени у већем броју индустријских грана. Већина боја поседује комплексну хемијску структуру, као и значајну хемијску стабилност, што чини њихову деградацију и уклањање веома тешким и изазовним проблемом. Потреба за новим технолошким решењима за уклањање широког спектра обојених ксенобиотика довела је до опсежног истраживања у пољу примењене ензимологије. С обзиром на то да су већином боје у индустрији ароматична азоједињења, ово их чини идеалним супстратом за деградацију пероксидазом из рена. Иако је велики број изоформи пероксидаза присутан у корену рена, већина истраживања фокусирана је на примену катјонских (базних) изоформи. Веома је мало публикованих радова о изоловању и примени других изоензима пероксидазе из рена. Киселе изоформе пероксидазе из рена немају комерцијални значај и бивају одбачене током процеса производње катјонских изоформи. У оквиру ове докторске дисертације упоредо су испитане киселе и базне изоформе пероксидазе из рена у обезбојавању, где је показано да киселе изоформе пероксидазе из рена остварују изузетно висок проценат обезбојавања у већини испитаних боја. Ово отвара нову перспективу у истраживању њихове примене у третману обојене отпадне воде, с обзиром на то да је детаљном провером литературних података установљено да је ово први пример примене ове изоформе у уклањању обојених ксенобиотика. Потенцијално високу цену производње ових изоформи услед мале заступљености могуће је превазићи имобилизацијом ензима. Међутим, услед присуства веома великог броја структурно различитих боја, готово је немогуће предвидети ефикасност биокатализатора поређењем имобилизата у односу на растворни ензим. Из тих разлога, у овој докторској дисертацији приказани су резултати синтезе и детаљног испитивања десет имобилизата добијених имобилизовањем киселе изоформе пероксидазе из рена на различитим носачима и применом неколико различитих метода.

Проблем обојене отпадне воде не може се посматрати само из угла уклањања већинског дела онечишћења. Проналажење ефикасне и економски исплативе, а са друге стране еколошки прихватљиве методе биоразградње комплексних обојених ксенобиотика, важан је предуслов за савремене методе биодеградације. У циљу испитивања екотоксиколошких ефеката обојених ксенобиотика и њихових производа деградације, примењен је тест акутне токсичности према јединкама *Artemia salina*. Показано је смањење стопе морталитета јединки након обезбојавања обојених ксенобиотика пероксидазом из рена. Међутим, последњих година намеће се потреба за детаљнијим испитивањем токсиколошких ефеката обојених ксенобиотика на што ближе моделу сисара. Мали је број публикованих радова који описују токсиколошки утицај боја на молекулском нивоу. У циљу што детаљније анализе ензимског третмана пероксидазом из рена испитана је екогенотоксичност осам модел боја применом основног и модификованог комет теста на BEAS-2B ћелијама. Иако су у литератури доступни подаци о примени ове методе у циљу процене оштећења DNA бојама, у овој докторској дисертацији први пут је описана примена модификованог комет теста у циљу детекције оксидативних оштећења пре и након ензимског третмана. На основу добијених података може се закључити да ова ензимска метода обезбојавања доводи до смањења екогенотоксиколошког потенцијала обојених ксенобиотика у смислу елиминације потенцијалне генотоксичности испитаних боја.

Г. Објављени и саопштени радови који су део докторске дисертације

Научни радови публиковани у међународним научним часописима:

1. **Janović B**, Collins A, Vujčić Z & Vujčić M. Acidic horseradish peroxidase activity abolishes genotoxicity of common dyes. *J. Hazard. Mater.* (2017) **321**, 576-585. (категорија M21a),
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389416308597?via%3Dihub>
2. **Janović B**, Mičić Vićovac M, Vujčić Z & Vujčić M. Tailor-made biocatalysts based on scarcely studied acidic horseradish peroxidase for biodegradation of reactive dyes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2017) *in press* doi: 10.1007/s11356-016-8100-4. (категорија M21),
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-016-8100-4>
3. Vujčić Z, **Janović B**, Lončar N, Margetić A, Božić N, Dojnov B & Vujčić M. Exploitation of neglected horseradish peroxidase isoenzymes for dye

decolorization. *Int. Biodeteror. Biodegrad.* (2014) **97**, 124-127. (категорија M22),
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830514003114?via%3Dihub>

Конгреси и саопштења:

1. **Janović B**, Vujčić Z & Vujčić M. Acidic horseradish peroxidase immobilization on chitosan beads for dye decolorization. *COST Action CM1303, System Biocatalysis, Biocatalysis as a Key Enabling Technology, Workshop*, 03-06 Oktobar (2017) Sijena, Italija. Final programme, page 8, P26. (категорија M34).
2. **Janović B**, Lončar N, Vujčić M & Vujčić Z. Study of DNA damage in the enzymatic reactions of textile reactive azo dyes decolorization. *Golden Jubilee meeting of the Serbian Chemical Society*, June 14-15 (2012) Belgrade, Serbia. Program & Book of abstracts BH P14, 115. ISBN: 978-86-7132-048-1. (категорија M64).

Поред наведених публикација које су проистекле из докторске дисертације, кандидат је коаутор на пет радова који су штампани у часописима категорије M21 и M22 и пет саопштења на научним скуповима међународног значаја штампаних у изводу (M34). Ове публикације су такође из области биохемије.

Д. Закључак

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације **Барбаре Јожеф** под насловом „**Примена растворних и имобилизованих изоформи пероксидазе из рена у уклањању обојених ксенобиотика из отпадне воде**“, закључила да је дисертација резултат самосталног рада кандидата, као и да добијени резултати представљају оригиналан научни допринос проучавању ензимског обезбојавања применом пероксидазе из рена, проширујући поље истраживања на, досада занемарене, киселе изоформе пероксидазе из рена. Кандидаткиња је успешно одговорила на све постављене задатке и циљеве који се тичу изоловања, пречишћавања и примене изоформи пероксидазе из рена са посебним освртом на генотоксичне ефекте полазних ксенобиотика и новонасталих производа након ензимске деградације.

Из ове докторске дисертације проистекла су три рада у међународним часописима, од чега је један у међународном часопису изузетних вредности (M21a), један у врхунском међународном часопису (M21), један у истакнутом међународном часопису (M22), као и два саопштења са међународних научних скупова (M34). Стога предлажемо Наставно-научном већу Хемијског факултета да кандидату Барбари Јожеф одобри одбрану докторске дисертације под наведеним насловом.

У Београду, 14. мај 2018.

Комисија:

др Зоран Вујчић, редовни професор
Хемијског факултета Универзитета у Београду, ментор

др Мирослава Вујчић, виши научни сарадник
ИХТМ- Центра за хемију Универзитета у Београду, ментор

др Душан Сладић, редовни професор
Хемијског факултета Универзитета у Београду, члан