

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU HEMIJSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 26. marta 2015. godine izabrani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata **Jovane R. STEFANOVIĆ KOJIĆ, dipl. biohem.**, istraživača saradnika Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju (IHTM), pod naslovom: **“SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST FUNKCIONALIZOVANIH DERIVATA POLISAHARIDA GUMIARABIKE, PULULANA I LEVANA”**. Na osnovu pregledane disertacije, podnosimo sledeći:

I Z V E Š T A J

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija Jovane Stefanović Kojić sadrži 197 strana teksta sa 77 slika i 14 tabela i čine je: Uvod (3 strane), Pregled literature (80), Materijal i metode (17), Rezultati i diskusija (53), Zaključak (4) i Literatura (40) sa 346 navoda. Doktorat ima Zahvalnicu, Rezime, Abstract, Spisak skraćenica, Sadržaj, Biografiju autora, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** kandidat ističe aktuelnost razvoja sistema za ciljanu dostavu lekova tehnologijama kojima se poboljšavaju efikasnost i bezbednost njihove upotrebe i kojima se kontrolišu njihove farmakokinetičke osobine, kao i razvoja hromogenih enzimskih supstrata kojima se omogućava direktna selekcija mikroorganizama koji proizvode ispitivane enzime na agarim podlogama i određivanje enzimske aktivnosti u preparatima različitog stepena čistoće. Cilj ove disertacije je bila sinteza hemijskih formulacija polienskih antibiotika i hromogenih glikozidaznih supstrata reakcijama kuplovanja niskomolekulskih agenasa (antibiotika nistatina i amfotericina B i antrahinonske boje Remazol Brilliant Blue R) sa polisaharidima (gumiarabikom, pululanom i levanom).

U **Pregledu literature** opisane su grupe hemijskih jedinjenja koje su u korišćene u eksperimentalnom radu: polisaharidi, antibiotici i boje. Detaljno su opisani polisaharidi biljaka i mikroorganizama, sa posebnim osvrtom na biljne eksudate (u koje spada gumiarabika) i mikrobne egzopolisaharide (pululan i levan). U poglavljima o antibioticima istaknuta je struktura, biološka aktivnost, mehanizam dejstva i neželjeni efekti upotrebe polienskih antibiotika i njihovih najznačajnijih predstavnika, nistatina i amfotericina B, kao i njihove fizičke i hemijske formulacije koje su komercijalno dostupne. Takođe, opisane su i sintetičke boje, njihova struktura i primena, među kojima su posebno objašnjene antrahinonske boje u koje spada Remazol Brilliant Blue R, kao i uloga hromogenih enzimskih supstrata.

U **Materijalu i metodama** opisani su svi materijali korišćeni u eksperimentalnom radu, kao i metode primenjene za hemijsku modifikaciju polisaharida i sintezu funkcionalizovanih derivata.

Za karakterizaciju dobijenih derivata i ispitivanje njihove stabilnosti korišćene su klasične laboratorijske i strukturne instrumentalne metode. Biološka aktivnost sintetisanih proizvoda određena je mikrobiološkim metodama i enzimskim testovima.

U delu doktorske disertacije **Rezultati i diskusija**, kandidat daje pregled i diskusiju dobijenih rezultata. U ovom poglavlju detaljno su obrazloženi mehanizmi oksidativne transformacije glikana natrijum-perjodatnim reagensom i funkcionalizacije parcijalno oksidovanih polisaharida sa predstavnicima polienskih antibiotika. Prikazani su rezultati određivanja stepena oksidacije i sadržaja aldehidnih grupa oksidovanih glikana, kao i rezultati karakterizacije sintetisanih konjugata instrumentalnim metodama i tankoslojnom hromatografijom, kojima je potvrđena retencija hemijske strukture antibiotika, a time i biološke aktivnosti. Takođe, upoređena je antimikrobna aktivnost sintetisanih derivata sa čistim antibioticima i dokazana stabilnost hemijskih formulacija antibiotika u suvom (liofilizovanom) obliku i u rastvoru (u funkciji vremena i na različitim pH vrednostima). Prikazani su i rezultati eksperimenta kontrolisanog oslobađanja antibiotika iz konjugata na dve pH vrednosti (pH 7,4 i pH 1,5). Opisan je mehanizam sinteze konjugata polisaharida sa antrahinonskom bojom i dobijeni funkcionalizovani derivati su okarakterisani instrumentalnim metodama strukturne analize. Dokazana je stabilnost sintetisanih derivata u uslovima neophodnim za njihovu aktivnost (na različitim pH vrednostima i u uslovima sterilizacije autoklaviranjem). Pokazano je da se ovi hromogeni konjugati mogu koristiti za "screening" mikroorganizama koji poseduju odgovarajuću glikanaznu aktivnost, kao i za procenu aktivnosti enzimskih preparata.

U delu doktorske disertacije **Zaključci**, kandidat sumira dobijene rezultate i njihovu diskusiju.

B. KRATKI OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

- Biljni polisaharid gumiarabika i mikrobni polisaharid pululan oksidovani su natrijum-perjodatnim reagensom u kontrolisanim uslovima. Ovom oksidativnom transformacijom generisane su u različitom stepenu reaktivne aldehidne grupe u nizove ovih glikana, u zavisnosti od reakcionih uslova.
- Sintetisani su konjugati perjodatno-oksidovanih polisaharida u reakciji sa polienskim antibioticima (nistatinom i amfotericinom B) kuplovanjem primarne amino-grupe antibiotika i aldehidne grupe parcijalno oksidovanih polisaharida.
- Rezultati karakterizacije konjugata pomoću standardnih instrumentalnih metoda (UV-Vis, FT-IR i ^1H NMR spektroskopija), kao i tankoslojnom hromatografijom, su ukazali da su molekuli antibiotika kovalentno vezani za polisaharidne nizove. Strukturnom karakterizacijom nastalih proizvoda dokazana je retencija strukture antibiotika koja je neophodan preduslov za njihovu aktivnost, a na osnovu rezultata TGA-DTA analiza zaključeno je da je reakcijom kuplovanja povećana stabilnost dobijenih proizvoda u temperaturnom opsegu od sobne temperature do 600 °C.
- Stabilnost konjugata u liofilizovanom obliku ispitivana je u toku vremenskog perioda od šest meseci. Uočeno je da ne dolazi do degradacije konjugata u tom vremenu, kao i da je vodeni rastvor derivata gumiarabike stabilniji od čistog nistatina nakon sedmodnevne inkubacije na

sobnoj temperaturi. Takođe, utvrđeno je da reakcija kuplovanja ima pozitivan efekat na povećanje stabilnosti vodenih rastvora nistatina u oblasti pH vrednosti 4,0 – 9,0; što je posebno izraženo u kiselim sredinama.

- Eksperimentom kontrolisanog oslobađanja antibiotika nistatina iz konjugata sa pululanom na dve pH vrednosti (pH 7,4 i pH 1,5) pokazano je da brzina i stepen oslobađanja rastu sa povećanjem kiselosti. Takođe, ustanovljeno je da je oslobađanje aktivne supstance katalizovano kiselinom, ali da se struktura nistatina ne menja ni u uslovima niskih pH vrednosti u ispitivanom vremenskom periodu, što je potvrđeno UV-Vis spektroskopijom.
- Ispitivanjem antifungalne aktivnosti sintetisanih polisaharidnih derivata na soj *Candida albicans* ATCC 24433 utvrđeno je da svi konjugati imaju očuvanu antimikrobnu aktivnost.
- Reakcijom kuplovanja polisaharida pululana i levana, koji je u velikom prinosu dobijen biosintezom pomoću sopstvenog bakterijskog soja, sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R dobijeni su stabilni hromogeni derivati polisaharida koji su okarakterisani spektroskopskim metodama (UV-Vis, FT-IR i NMR spektroskopijom), kao i elementalnom organskom mikroanalizom i tankoslojnom hromatografijom.
- Ispitivanjem stabilnosti rastvora sintetisanih hromogenih derivata simultanom TGA-DTA analizom utvrđeno je da se kuplovanjem sa termalno stabilnijom antrahinonskom bojom povećava stabilnost konjugata u poređenju sa čistim polisaharidom.
- Utvrđeno je da su konjugati pululana sa bojom RBBR stabilni u širokom opsegu pH vrednosti (pH 4,0 – 9,0) i da mogu da se koriste u uslovima u kojima postoji specifičan zahtev za određenim puferom ili posebnim uslovima rasta mikroorganizma. Takođe, pokazano je da u uslovima sterilizacije autoklavom ne dolazi do destabilizacije derivata i da sintetisani konjugat može da se koristi za „screening” mikroorganizama na pululanaznu aktivnost.
- Testom na Petri šolji, kao i testom sa komercijalnim enzimom pululanazom pokazano je da sintetisani derivat može da se koristi kao hromogeni supstrat za direktnu detekciju pululanazne aktivnosti na agarnoj podlozi, kao i u rastvoru.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Sinteze fizičkih formulacija antibiotika kojima se uspešno menjaju fizičko – hemijski parametri i kontrolišu farmakokinetička svojstva (apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija), koje su do sada opisane u literaturi ne prevazilaze još uvek probleme koji se odnose na proces proizvodnje, zbog čega je istraživanje na ovom polju i dalje veoma aktuelno. Takođe, opisane sinteze hemijskih formulacija antibiotika konjugacijom sa polimerima rastvornim u vodi, koji su uglavnom sintetički, imunogeni i nisu biodegradabilni, nisu dale zadovoljavajuće rezultate. U ovom radu prvi put je opisana sinteza konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B, kao i karakterizacija dobijenih proizvoda. Funkcionalizacija ovih polisaharida pomoću amino-grupa polienskih antibiotika pokazala se kao pogodan metod za sintezu formulacija nistatina i amfotericina B i to do sada nije ispitivano.

Enzimski testovi koji se zasnivaju na korišćenju hromogenih supstrata koriste se u savremenoj mikrobiološkoj i biohemijskoj dijagnostici i preduslov su za brzo, rutinsko određivanje

aktivnosti mnogih enzima, zbog čega su i istraživanja u ovoj oblasti veoma značajna. Hromogeni polisaharidni supstrati za ispitivanje aktivnosti pululanaza i levanaza, glikozidaza čija aktuelnost sve više raste, sintetisani su funkcionalizacijom pululana i levana sa amino-grupom antrahinonske boje RBBR i detaljno okarakterisani, što do sada nije ispitivano. Rađen je „screening” mikroorganizama koji poseduju pululanaznu i levanaznu aktivnost direktnom selekcijom na agarnim podlogama. Upotrebljeni levan je iz ove klase mikrobnih polisaharida novi proizvod biosinteze pomoću sopstvenog bakterijskog soja.

D. OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA ČINE DEO DISERTACIJE

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M₂₂ – 5 poena)

1. J. Stefanović, D. Jakovljević, G. Gojgić-Cvijović, M. Lazić, M. Vrvic, Synthesis, characterization, and antifungal activity of nystatin-gum arabic conjugates, *J. Appl. Polymer Sci.*, 127 (6) (2013) 4736–4743

Rad u međunarodnom časopisu (M₂₃ – 3 poena)

1. B. D. Kekez, G. D. Gojgic-Cvijovic, D. M. Jakovljevic, J. R. Stefanovic Kojic, M. D. Markovic, V. P. Beskoski, M. M. Vrvic, High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175 (2015) 3068–3083

Predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u celini (M₃₁ – 3 poena)

1. Jovana R. Stefanović, Miroslav M. Vrvic, Microbial polysaccharides: between oil wells, food and drugs, Proceedings of 6th Central European Congress on Food – CEFood, Novi Sad, May 23-26 2012, p. 994-999

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M₃₃ – 1 poen)

1. J. R. Stefanović, D. M. Jakovljević, G. Đ. Gojgić-Cvijović, M. M. Vrvic, Synthesis of gum Arabic-natamycin conjugate, Proceedings of 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry “Physical Chemistry 2012”, Belgrade, September 24-28, 2012, p.544-546
2. D. Jakovljević, J. Stefanović, D. Ilić, G. Gojgić-Cvijović, M. Vrvic, Green synthesis of silver nanoparticles using *Bacillus licheniformis* strain, Proceedings of 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry “Physical Chemistry 2012”, Belgrade, September 24-28, 2012, p.447-449

3. J. Stefanović, D. Ilić, B. Kekez, G. Gojgić-Cvijović, D. Jakovljević, M. Vrvić, Characterization of exopolysaccharide produced by *Bacillus sp.* NS032, Proceedings of 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry "Physical Chemistry 2012", Belgrade, September 24-28, 2012, p. 541-543
4. J. R. Stefanović, D. M. Jakovljević, G. Đ. Gojgić-Cvijović, M. M. Vrvić, Synthesis and antifungal activity of pullulan-amphotericin B conjugate, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry "Physical Chemistry 2010", Proceedings, 2010, Belgrade, 21-24 September 2010, 485-487
5. D. M. Jakovljević, J. R. Stefanović, G. Đ. Gojgić, M. M. Vrvić, Preparation of a stained polysaccharide, a potential substrate to evaluate certain specific enzymes, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry "Physical Chemistry 2010", Proceedings, 2010, Belgrade, 21-24 September 2010, 494-496
6. D. Jakovljević, J. Kecić, J. Stefanović, M. Jovičin, M. Vrvić, Determination of glycogen from rumen protozoa, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry "Physical Chemistry 2010", Proceedings, 2010, Belgrade, 21-24 September 2010, 518-520

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M₃₄ – 0,5 poena)

1. Djuric A., Ilic D., Stefanovic Kojic J., Gojgic-Cvijovic G., Jakovljevic D., Beskoski V., Vrvić M., Synthesis of pullulan-based silver nanoparticles and their antimicrobial activity for prevention of food spoilage; 5th Congress of Macedonian Microbiologists, Book of Abstracts and Programme, p. 145 (Ohrid, 28-31 May 2014)
2. Aleksandra Đurić, Branka Kekez, Jovana Stefanović Kojić, Dragica Jakovljević, Gordana Gojgić-Cvijović, Ljubiša Ignjatović, Vladimir P. Beškoski, Miroslav M. Vrvić, Partial characterization of levan from *Brachybacterium sp.* CH-KOV3; 12th Young Research Conference – Materials Science and Engineering, December 11-13, 2013, Belgrade, Serbia, p. 8
3. Branka Kekez, Marija Lješević, Aleksandra Đurić, Jovana Stefanović Kojić, Dragica Jakovljević, Gordana Gojgić-Cvijović, Vladimir P. Beškoski, M. M. Vrvić, Microbial polysaccharides as a prospective base for new materials; 12th Young Research Conference – Materials Science and Engineering, December 11-13, 2013, Belgrade, Serbia, p. 8
4. B. Kekez, M. Lješević, J. Stefanović, G. Gojgić-Cvijović, D. Jakovljević, V. Beškoski, M.M. Vrvić, Fructan from *Bacillus sp.* NS032 – preparation, characterization and antioxidant activities *in vitro*; Abstract book of the Belgrade Food International Conference »Food, health and well being«, Belgrade, Serbia, Nov 26-28 2012, p. 90
5. J. R. Stefanović, D. D. Ilić, D. M. Jakovljević, G. Đ. Gojgić-Cvijović, M. M. Vrvić, Exopolysaccharides from *Bacillus licheniformis*: Production, partial characterization and emulsifying activity; 7th Balkan Congress of Microbiology "Microbiologia Balkanica 2011", October 25-29, 2011 Belgrade, Serbia
6. Jovana R. Stefanović, Aleksandra R. Savić, Dragica M. Jakovljević, Gordana Đ. Gojgić-Cvijović, Miroslav M. Vrvić, Nutritive and biological values of some *Pyrus* varieties growing in Serbia; Abstracts of the 2nd FCUB ERA Workshop "Food Chemistry and Biotechnology", October 18-19, 2011 Belgrade, Serbia, p. 51

7. Jovana R. Stefanović, D.D. Ilić, D.M. Jakovljević, G.Đ. Gojgić-Cvijović, M.M. Vrvic, Synthesis of stable silver nanoparticles using aqueous solutions of pullulan and its polyaldehydes; Programme of 3rd International Symposium on Metallomics "Metallomics 2011", June 15-18, 2011 Münster, Germany
8. Stefanović, J., Jakovljević, D., Gojgić-Cvijović, G., Vrvic, M., Microbial exopolysaccharide pullulan: Oxidative modification, 1st Workshop "Regional perspectives in food safety" at the Center of Excellence for Food Safety and Emerging Risk (CEFSE) and 12th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregion Conference on Food, Environment and Health, Book of Abstracts, 2010, Novi Sad, 14-15. 9. 2010., 76

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M₆₃ – 0,5 poena)

1. Jovana Stefanović, Dragica Jakovljević, Gordana Gojgić-Cvijović, Miroslav Vrvic, Sinteza i antifungalna aktivnost konjugata gumiarabike i amfotericina B, XLVIII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Knjiga radova, 2010, Novi Sad, 17-18. april 2010., 208-211
2. Jovana Stefanović, Dragica Jakovljević, Milanka Radulović, Gordana Gojgić-Cvijović, Miroslav Vrvic, Oksidativna modifikacija mikrobnog polisaharida pululana, XV Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova, Vol. 15 (17), 2010, Čačak, 26-27. mart 2010., 793-798

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M₆₄ – 0,2 poena)

1. B. Kekez, A. Đurić, M. Lješević, J. Stefanović Kojić, D. Jakovljević, G. Gojgić-Cvijović, V. Beškoski, M.M. Vrvic; Polisaharidi levanskog tipa iz *Bacillus sp.* NS032 i *Brachy bacterium sp.* CH-KOV3: optimizacija produkcije; IX kongres mikrobiologa Srbije, Udruženje mikrobiologa Srbije, Knjiga Apstrakata, Beograd 30. maj – 01. jun 2013 (ISBN 978-86-914897-1-7)
2. Aleksandra Đurić, Jovana Stefanović Kojić, Dragica Jakovljević, Gordana Gojgić-Cvijović, Vladimir P. Beškoski; Fruktan iz *Brachy bacterium sp.* CH-KOV3 - izolovanje, prečišćavanje i delimična karakterizacija; 6. Simpozijum Hemija i zaštita životne sredine »Envirochem 2013«, Srpsko hemijsko društvo, Knjiga izvoda st. 360-361, Vršac 21-24. maj 2013 (ISBN 978-86-7132-052-8)
3. Jovana R. Stefanović, Dragica M. Jakovljević, Gordana Đ. Gojgić-Cvijović, Miroslav M. Vrvic, Termalna stabilnost konjugata polienskog antibiotika sa polisaharidom; Program i kratki izvodi radova, 49. Savetovanje Srpskog hemijskog društva (Kragujevac 13-14. maj 2011), str. 92

E. ZAKLJUČAK

U doktorskoj disertaciji Jovane R. STEFANOVIĆ KOJIĆ, diplomiranog biohemičara, prikazani su i diskutovani dobijeni rezultati sinteze, strukturne karakterizacije i ispitivanja biološke aktivnosti funkcionalizovanih glikanskih derivata reakcijama kuplovanja polisaharida (gumiarabike, pululana i levana) sa niskomolekulskim agensima (polienskimi antibioticima nistatinom i amfotericinom B i antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R).

Kandidatkinja je u doktorskoj disertaciji izložila rezultate i zaključke koji predstavljaju značajan i originalan naučni doprinos u razumevanju i primeni biljnih i mikrobnih polisaharida, što je publikovano u jednom radu u istaknutom međunarodnom časopisu (M₂₂) u kojem je kandidat prvi i korespondirajući autor i u jednom radu štampanom u časopisu međunarodnog značaja (M₂₃). Kandidatkinja ima i 20 drugih naučnih rezultata, što je taksativno navedeno u spisku koji sadrži ovaj Izveštaj u delu D.

Na osnovu svega prikazanog, a u skladu sa Statutom Hemiskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću da predatu doktorsku disertaciju kandidata Jovane R. STEFANOVIĆ KOJIĆ, diplomiranog biohemičara, pod naslovom: “SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST FUNKCIONALIZOVANIH DERIVATA POLISAHARIDA GUMIARABIKE, PULULANA I LEVANA”, prihvati i odobri odbranu za sticanje akademskog zvanja DOKTORA BIOHEMIJSKIH NAUKA.

K o m i s i j a

Dr Miroslav M. VRVIĆ, redovni profesor – mentor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Dragica M. JAKOVLJEVIĆ, naučni savetnik – mentor
Centar za hemiju IHTM, Univerzitet u Beogradu

Dr Ljuba M. MANDIĆ, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Gordana Đ. GOJGIĆ - CVIJOVIĆ, naučni savetnik
Centar za hemiju IHTM, Univerzitet u Beogradu

Dr Vladimir P. BEŠKOSKI, docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Beograd, 10.11.2015.