

Факултет ТЕХНОЛОШКО-
МЕТАЛУРШКИ

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

35/315

Веће научних области техничких наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

15.01.2024.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације
и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Ензимска синтеза олигомера флавоноида и хемијска и биолошка
карактеризација (Enzymatic synthesis of flavonoid oligomers and chemical and biological
characterization)

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ ТЕХНОЛОШКО ИНЖЕЊЕРСТВО

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

Ана (Живорад) Вукоичић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду,

Технолошко-металуршки факултет, Мастер студије, Мастер инжењер технологије

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2020.

4. Година уписа на докторске студије: 2020.
-

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Биохемијско инжењерство и биотехнологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ :

Име и презиме ментора: др Дејан Безбрадица

Звање: Редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Milivojević A., Ćorović M., Simović M., Banjanac K., Pjanović R., **Bezbradica D.** (2022) Evaluation of *In Vitro* Skin Permeation of Enzymatically Synthesized Phloridzin Acetates from Emulsions and Liposomes Dispersed in Gel. *European Journal of Lipid Science and Technology* 124: 2200073 (ISSN 1438-7697; IF=3,196)
2. Milivojević A., Ćorović M., Simović M., Banjanac K., **Bezbradica D.** (2020) Flavonoid esters synthesis using novel biocatalytic systems - CAL B immobilized onto LifeTech™ ECR supports. *Biochemical Engineering Journal* 163: 107748 (ISSN: 1369-703X; IF=3,475).
3. Bebić J., Banjanac K., Ćorović M., Milivojević A., Simović M., Marinković A., **Bezbradica D.** (2020) Immobilization of laccase from *Myceliophthora thermophila* on functionalized silica nanoparticles: Optimization and application in lindane degradation. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 28: 1136-1144 (ISSN 1004-9541; IF=3,898)
4. Bebić J., Banjanac K., Rusmirović J., Ćorović M., Milivojević A., Simović M., Marinković A., **Bezbradica D.** (2020) Amino-modified kraft lignin microspheres as a support for enzyme immobilization. *RSC Advances* 10: 21495-21508 (ISSN 2046-2069; IF=4,036)
5. Veljković M., Stepanović R., Banjanac K., Ćorović M., Milivojević A., Simović M., Milivojević M., **Bezbradica D.** (2023) Continuous production of fructo-oligosaccharides using selectively immobilized fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* onto Purolite® A109. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 117: 149-156. (ISSN 1226-086X; IF= 6,760)

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Петар Ускоковић

- Прилог 1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

ДП

На основу чл. 40. став 3. Закона о високом образовању, чл. 112. став 3. Статута Универзитета у Београду, чл. 88. став 3. Статута ТМФ-а и чл. 43. Правилника о докторским студијама ТМФ-а на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета од 26.12.2023. године, донета је

О Д Л У К А

о прихватању Реферата Комисије за оцену подобности теме и кандидата
за израду докторске дисертације

Прихвата се Реферат Комисије за оцену подобности теме и кандидата и одобрава израда докторске дисертације **Ане Вукоичић**, број индекса 4002/20, под називом: **„Ензимска синтеза олигомера флавоноида и хемијска и биолошка карактеризација(Enzymatic synthesis of flavonoid oligomers and chemical and biological characterization)“**.

Одлуку о давању сагласности на предлог теме докторске дисертације доноси Универзитет у Београду.

За ментора се одређује др Дејан Безбрадица, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет.

Одлуку доставити: Универзитету у Београду, кандидату, ментору, Служби за наставно студентске послове и архиви Факултета.

Д Е К А Н

Проф. др Петар Ускоковић

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата Ане Вукоичић за израду докторске дисертације

Одлуком 35/260 бр. Од 9.11.2023. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Ане Вукоичић за израду докторске дисертације и научне заснованости теме **„Ензимска синтеза олигомера флавоноида и хемијска и биолошка карактеризација“ (“Enzymatic synthesis of flavonoid oligomers and chemical and biological characterization”)**

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Ана Ж. Вукоичић, мастер инжењер технологије, рођена је 03.10.1996. године у Краљеву. Основну школу завршила је у Врњачкој Бањи, где је у бањској Гимназији наставила средње образовање. По завршетку средње школе, 2015. године уписала је основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Овај степен студија завршила је 2019. године са просечном оценом 9,94, након чега је своје образовање наставила на истој установи уписавши мастер академске студије. Септембра 2020. одбранила је мастер рад на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију са оствареним просеком 10,00. Добитница је награда Панта С. Тутунџић које Технолошко-металуршки факултет додељује студентима за остварен успех у току школовања. Током студирања остварила је право на коришћење стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја као и стипендије Доситеја Министарства омладине и спорта - Фонд за младе таленте. Поред високог нивоа знања енглеског и шпанског језика, поседује и основно знање француског језика. Школске 2020/2021. године уписује докторске академске студије на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија под менторством проф. др Дејана Безбрадице. Кандидаткиња је одслушала све предмете предвиђене планом и програмом и положила све испите са просечном оценом 10,00. Од априла 2021. запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у звању истраживач приправник. Током 2022. године, провела је пет недеља у истраживачкој посети Институту за катализу и петрохемију (Institute of Catalysis and Petrochemistry, CSIC) у

Мадриду у оквиру COST акције CA18132 “Functional Glyconanomaterials for the Development of Diagnostics and Targeted Therapeutic Probes (GlycoNanoProbes)”. Ангажована је и на пројекту у оквиру програма ИДЕЈЕ Фонда за науку Републике Србије под називом „Prebiotics for functional food and bioactive cosmetics produced in intensified enzymatic processes“ (PrIntPrEnzy), а укључена је и у реализацију европског пројекта „Twinning for intensified enzymatic processes for production of prebiotic containing functional food and bioactive cosmetics“ (TwinPrebioEnz) који финансира програм Horizon Europe 2021-2027. У оквиру овог пројекта провела је четири недеље у истраживачкој посети Медицинском центру Универзитета Радбауд у Најмехену (Холандија). Истраживачки рад кандидаткиње на докторским студијама усмерен је ка развоју ензимских поступака производње олигомера флавоноида са слободним и имобилисаним лаказима, развоју хроматографских метода (HPLC и HPLC-MS/MS) за идентификацију производа различитог степена полимеризације као и њиховој структурној и биолошкој карактеризацији. Коаутор је једног рада у међународном часопису изузетног значаја (M21a), једног рада у врхунском међународном часопису (M21), једног рада у међународном часопису (M23) и пет саопштења на међународним скуповима штампаним у изводу (M34).

1.2. Сечено научно-истраживачко искуство

Ана Вукоичић је положила све испите предвиђене планом и програмом докторских академских студија, као и завршни испит са темом „Синтеза олигомера флавоноида катализована лаказом“. Списак положених испита, остварених ЕСПБ бодова и оцена приказани су у табели која следи:

<u>Назив предмета</u>	<u>ЕСПБ</u>	<u>Оцена</u>
1. Хемијска кинетика	5	10
2. Одабрана поглавља нумеричке анализе	5	10
3. Специјална поглавља преноса масе	4	10
4. Одабрана поглавља инструменталне анализе	7	10
5. Одабрана поглавља биохемије – витамини	5	10
6. Санитарна микробиологија	4	10
7. Биохемијска кинетика	5	10
8. Биоактивне материје у козметичким производима	4	10
9. Индустриска микробиологија	5	10
10. Имобилизани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	6	10
11. Енглески језик	-	10
12. Завршни испит	30	10
	Збир ЕСПБ поена: 80	Просечна оцена: 10,00

Изабрана је у звање истраживач приправник 8.4.2021. године, а од 16.4.2021. године је запослена у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИИИ 46010). Помагала је у експерименталном раду и обради резултата 2 мастер рада студената на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију.

У оквиру научно-истраживачког рада Ана Вукоичић се бавила истраживањима усмереним на развој поступака заснованим на примени слободне и имобилисане лаказе у синтези олигомера флавоноида и разградњи токсичних једињења. На основу досадашњих резултата ових истраживања коаутор је једног рада у међународном часопису изузетне вредности (M21a), једног рада у врхунском међународном часопису (M21), једног рада у међународном часопису (M23) и пет саопштења на међународним скуповима штампаним у изводу (M34).

Списак објављених научних радова и саопштења:

Рад у међународном часопису изузетне вредности (M21a):

1. Petrov Ivanković A., Milivojević A., Ćorović M., Simović M., Banjanac K., Jansen P., **Vukoičić A.**, van den Bogaard E., Bezbradica D.: *In vitro evaluation of enzymatically derived blackcurrant extract as prebiotic cosmetic ingredient: extraction conditions optimization and effect on cutaneous microbiota representatives*. Chemical and Biological Technologies in Agriculture (2023), Vol. 10, Issue 1, 125. IF(2022)=6,6. DOI: 10.1186/s40538-023-00502-8

Рад у врхунском међународном часопису (M21):

1. Salih R., Banjanac K., **Vukoičić A.**, Gržetić J., Popović A., Veljković M., Bezbradica D., Marinković A.: *Acrylic modified kraft lignin microspheres as novel support for immobilization of laccase from M. thermophila expressed in A. oryzae (Novozym® 51003) and application in degradation of anthraquinone textile dyes*. Journal of Environmental Chemical Engineering (2023), Vol. 11, Issue 1, 109077. IF(2022)=7,7; DOI: 10.1016/j.jece.2022.109077

Рад у међународном часопису (M23):

1. Bebić J., Banjanac K., Ćorović M., Milivojević A., Simović M., **Vukoičić A.**, Mitrović D., Bezbradica D.: *Immobilization of laccase from Trametes versicolor on Lifetech™ supports for applications in degradation of industrial dyes*. Hemijska Industrija (2020), Vol. 74, Issue 3, pp. 197-209. IF(2020)=0,627; DOI:10.2298/HEMIND200320016B

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

1. Petrov, A., Ćorović, M., Milivojević A., Skenderija J., **Vukoičić A.**, Pjanović R., Bezbradica D.: *Effect of galacto-oligosaccharides on Staphylococcus epidermidis growth and examination of their diffusion from cosmetic formulations*. 7th International Congress of Engineering, Environment and Materials in Process Industry, Jahorina, Republic of

- Srpska, Bosnia and Hercegovina, 2021, Book of Abstracts, pp. 140, ISBN: 978-99955-81-38-1.
2. Veljković M., Simović M., Petrov Ivanković A., **Vukoičić A.**, Banjanac K., Bezbradica D.: *In situ transformation of sucrose in maple syrup in order to produce fructo-oligosaccharide enriched product*. 10th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Croatia, 2022, Book of Abstracts, pp. 152-153, ISSN 2975-4313.
 3. Petrov Ivanković A., Veljković M., **Vukoičić A.**, Milivojević A., Ćorović M., Pjanović R., Bezbradica D.: *Enzyme-assisted extraction of various bioactive components from blackcurrant (*Ribes nigrum*)*. 10th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Croatia, 2022, Book of Abstracts, pp. 145-146, ISSN 2975-4313.
 4. Veljković M., Simović M., Banjanac K., Milivojević A., Ćorović M., **Vukoičić A.**, Bezbradica D.: *Effective approach for obtaining high-purity prebiotics using membrane separation technology*. International Scientific Conference Green Agenda for Western Balkans, Belgrade, Serbia, 2023, Book of Abstracts, pp. 25, ISBN 978-86-6283-140-8.
 5. **Vukoičić A.**, Milivojević A., Banjanac K., Petrov Ivanković A., Ćorović M., Marinković A., Palomo J.M., Bezbradica D.: *Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on different nanocarriers and its application in the synthesis of flavonoid oligomers*. International Scientific Conference Green Agenda for Western Balkans, Belgrade, Serbia 2023, Book of Abstracts, pp. 27, ISBN 978-86-6283-140-8.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија, Ана Вукоичић, мастер инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Истраживање на предложеној теми докторске дисертације укључује експериментални рад у области оптимизације ензимских реакција применом статистичких метода експерименталног планирања, развоја нових имобилисаних ензима, примене слободне и имобилисане лаказе у реакцијама полимеризације полифенолних једињења или деградације индустријских боја и хемијске и биолошке карактеризације добијених једињења применом инструменталних метода хемијске анализе и лабораторијских метода за одређивање биолошке активности, а кандидаткиња је стекла значајно искуство и вештине неопходне за ове експерименталне активности током израде завршног и мастер рада, као и током истраживачких боравака у научно-истраживачким институцијама у Шпанији и Холандији. У области истраживања била је коаутор једног рада у међународном часопису изузетног значаја (M21a), једног рада у врхунском међународном часопису (M21), једног рада у међународном часопису (M23) и пет саопштења на међународним скуповима штампаним у изводу (M34). На основу свега наведеног, Комисија закључује да кандидаткиња испуњава услове за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је ензимска производња олигомера флавоноида и хемијска и биолошка карактеризација добијених производа ради евалуације могућности примене ове групе једињења у прехранбеним и козметичким

производима. Флавоноиди представљају велику класу секундарних метаболита биљака која броји преко 6000 идентификованих једињења. Присутни су у воћу, поврћу, чају, зачинима, меду и прополису, вину, итд. те су намирнице биљног порекла главни извор флавоноида за човека. Према хемијској структури, флавоноиди су полифенолна једињења ниске молекулске масе, која се у природи могу наћи и у облику гликозида. Многи испитани представници ове групе једињења показују широк опсег фармаколошких дејстава и позитиван утицај на здравље човека те су примену нашли у медицини, као и у козметичким и фармацеутским препаратима. Њихово дејство огледа се у испољавању антимикробне, антивирусне, антиинфламаторне, антиоксидативне и антиканцерогене активности. Корелација између биолошке активности и хемијске структуре је врло комплексна и многобројна истраживања указују на то да различити типови хемијске модификације флавоноида (гликозиловање, естерификација, хидролиза) доводе до одређених промена различитих врста биолошке активности. Такође, хемијске модификације доводе до промене физичко-хемијских карактеристика полазног флавоноида које су од значаја за њихово касније инкорпорирање у различите индустријске производе. На пример, многе флавоноиде карактерише ограничена растворљивост и хемијска или термичка стабилност, па се хемијском модификацијом може постићи побољшање ових технолошких карактеристика од великог значаја за проширење опсега њихове примене. Синтеза олигомера или полимера флавоноида се такође може применити као вид хемијске модификације флавоноида у циљу добијања нових једињења измењених технолошких карактеристика и биолошке активности у односу на полазно једињење. Често полимеризацијом може доћи и до формирања нових хромофора унутар молекула па олигомери имају потенцијалну примену и као индустријске боје које су биокомпатибилне и биодеградабилне.

Због потенцијалних области примене (индустрија хране и козметички производи) пожељно је да се синтеза ове групе једињења изводи ензимским поступцима јер су селективни и не одвијају се у екстремним условима притиска и температуре па не доводе до настајања потенцијално токсичних споредних производа и губитка биолошке активности производа. Ензимски поступци синтезе олигомера флавоноида и других полифенолних једињења заснивају се углавном на примени лаказе (1,4-бензендиол:кисеоник оксидоредуктазе (ЕС 1.10.3.2)). Лаказе су ефикасни и широко примењивани ензими из групе оксидоредуктаза, чија је примарна функција у природи да катализују оксидацију фенолних једињења, али се у овој реакцији користи чињеница да оксидовани супстрат може да реагује и са другим фенолним молекулима и довести до настајања производа полимеризације. Током реакције може доћи до формирања производа различитог степена полимеризације и структуре, а у зависности од порекла, лаказе испољавају различиту каталитичку активност што може довести и до развоја уско селективних процеса синтезе олигомера тачно дефинисаних особина. Велика предност лаказа је извођење селективних реакција у благим условима, с обзиром на то да ови ензими не захтевају присуство токсичних једињења већ користе молекулски кисеоник, а као једини споредни производ реакције настаје вода.

У литератури се може пронаћи неколико примера синтезе олигомера флавоноида катализованих лаказама. Једна од најчешће коришћених је лаказа из *Trametes versicolor* која је комерцијално доступна и чије је деловање забележено на више типова флавоноида (рутин, ескулин, катехин, кверцетин и кемпферол), а потврђена је и активност лаказа изолованих из *Myceliophthora* sp., *Ustilago maydis*, *Agaricus bisporus*, *Trametes*

pubescens, *Pycnoporus coccineus* и *Pycnoporus sanguineus*. Досадашња истраживања су показала да се полимеризацијом катализованом лаказама добија смеша олигомера степена полимеризације између 2 и 10, а испитивања различитих врста биолошке активности су показала да олигомеризација може имати различите ефекте. На пример, показано је да антиоксидативна активност може бити смањена у односу на полазни флавоноид при синтези олигоескулина, али је установљено да поједини олигомери флавоноида имају израженију антитуморску активност или инхибиторну активност на ксантин оксидазу. Циљ ове докторске дисертације је развој ефикасних ензимских поступака за синтезу олигомера флавоноида и евалуација потенцијалне примене ових једињења у производима различитих индустријских сектора хемијском и биолошком карактеризацијом. Почетна фаза истраживања биће посвећена одабору најпогодније лаказе за синтезу ових једињења и оптимизацији услова синтезе. Биће примењени комерцијални препарати (лаказа из *T. versicolor* и лаказа изолована из *Myceliophthora thermophila* произведене од стране генетски модификоване гљиве *Aspergillus* sp.), а одабир ће бити изведен након примене ензима у ензимској олигомеризацији неколико флавоноида (ескулин, флоридзин, нарингин, рутин). Оптимизација процеса ензимске олигомеризације биће изведена применом статистичких метода планирања експеримената и методе одзивних површина и омогућиће одређивање оптималних вредности кључних реакционих параметара (састав растварача, температура, концентрација ензима, концентрација супстрата) са циљем постизања максималног степена конверзије флавоноида и приноса производа. Ток реакције биће праћен методом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC) са UV/VIS детекцијом, а степен полимеризације производа реакције биће одређен применом течне хроматографије високих перформанси са масеном спектрометријом (HPLC-MS). У наредној фази истраживања биће изведена хемијска карактеризација добијених олигомера флавоноида тако што ће добијени производи различитог степена полимеризације бити изоловани применом препаративне течне хроматографије, а њихова структура биће одређена нуклеарно магнетно-резонантном (NMR) спектроскопијом. Подаци о типу и положају формиране везе између флавоноида, заједно са подацима о кинетици реакције олигомеризације, даће научни допринос у расветљавању механизма реакције олигомеризације флавоноида. Биолошка активност смеше олигомера и појединачних фракција добијених препаративном хроматографијом биће анализирана одређивањем антиоксидативне активности применом различитих метода (ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC) и испитивањем утицаја на раст различитих микроорганизама. Биће испитано антимикубно дејство синтетисаних олигомера према чистим културама неколико патогених микроорганизама (грам позитивне бактерије *Staphylococcus aureus*, грам негативне бактерије *Escherichia coli* и квасац *Candida albicans*). Поред тога, биће испитан и утицај ове групе једињења на раст појединих представника пожељне хумане микробиоте (кожне и цревне), као што су бактерије *Staphylococcus epidermidis* и *Lactobacillus plantarum* и квасац *Saccharomyces boulardii*, ради идентификовања потенцијалног пребиотског дејства ових једињења. Добијени резултати ће омогућити да се одреди утицај полимеризације на биолошку активност флавоноида, као и одређивање оптималног степена полимеризације из аспекта различитих типова биолошке активности. Завршна фаза истраживања биће фокусирана на побољшање активности, специфичности и стабилности биокатализатора за синтезу олигомера флавоноида. Биће изведена имобилизација лаказе на комерцијалне макропорозне полиметакрилатне и полистиренске носаче, наносилику и наноцелулозу применом различитих метода имобилизације -

адсорпције и ковалентне имобилизације. Ради ефикасне ковалентне имобилизације биће извршене и модификације носача увођењем различитих функционалних група. Иmobилизација ензима биће примењена и као средство за модификовање специфичности ензима и контроле степена полимеризације финалних производа. Са истим циљем биће као катализатори испитани и бионанохибриди добијени инкорпорирањем јона метала (бабра или мангана) у протеинску структуру, у слободном и имобилисаном облику. Последњих година објављена су бројна истраживања која се, из различитих аспеката, баве проблематиком која ће бити обрађена у овој докторској дисертацији. У даљем тексту наведена су само најважнија која представљају основу за истраживања у оквиру ове докторске дисертације:

1. Desentis-Mendoza R.M., Hernandez-Sanchez H., Moreno A., Rojas C., Chel-Guerrero L., Tamariz J., Jaramillo-Flores M.E.: Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*, *Biomacromolecules* 7 (2006) 1845 – 1854
2. Uzan E., Poret B., Lubrano C., Milesi S., Favel A., Lesage-Meessen L., Lomascolo A.: Pycnoporuc laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications, *Appl Microbiol Biotechnol* 90 (2011) 97 – 105
3. Jeon J.R., Baldrian P., Murugesan K., Chang Y.S.: Laccase-catalysed oxidation of naturally occurring phenols: from *in vivo* biosynthesis pathways to green synthetic applications, *Microbial Biotechnology* 5 (2012) 318 – 332
4. Latos-Brozio M., Masek A., Piotrowska M.: Polymeric Forms of Plant Flavonoids Obtained by Enzymatic Reactions, *Molecules* 27 (2022) 3702
5. Anthony J., Humeau C., Maia E.R., Chebil L., Engasser J.M., Ghoul M., Enzymatic synthesis of oligoesculin: structure and biological activities characterizations, *Eur Food Res Technol* 231 (2010) 571-579
6. Muñoz-Mouro A., Gullón B., Lú-Chau T.A., Moreira M.T., Lema J.M., Eibes G.: Laccase Activity as an Essential Factor in the Oligomerization of Rutin, *Catalysts* 8 (2018) 321
7. Pivec T., Kargl R., Maver U., Bračić M., Elschaner T., Žagar E., Gradišnik L., Kleinschek K.S.: Chemical Structure-Antioxidant Activity Relationship of Water-Based Enzymatic Polymerized Rutin and Its Wound Healing Potential, *Polymers* 11 (2019) 1566
8. Chebil L., Ben Rhouma G., Chekir-Ghedira L., Ghoul M.: Enzymatic Polymerization of rutin and Esculin and Evaluation of the Antioxidant Capacity of Poly rutin and Polyesculin, *in D. Ekinici: Biotechnology*, IntechOpen (2015)
9. Mokdad-Bzeouich I., Mustapha N., Chaabane F., Ghedira Z., Ghedira K., Ghoul M., Chebil L., Chekir-Ghedira L.: Oligomerization of esculin improves its antibacterial activity and modulates antibiotic resistance, *The Journal of Antibiotics* 68 (2015) 148 – 152
10. Zhou H., Liu C., Geng S.: Laccase Catalyzed Oxidative Polymerization of Phloridzin: Polymer Characterization, Antioxidant Capacity and α -Glucosidase Inhibitory Activity, *Natural Products Communication* 16 (2021) 1 – 4
11. Anthony J., Lionneton F., Wieruszkeski J.M., Magdalou J., Engasser J.M., Chebil L., Humeau C., Ghoul M.: Investigation of enzymatic oligomerization of rutin, *Rasayan J. Chem* 1 (2008) 718 – 731

12. Muñiz-Mouro A., Oliveira I.M., Gullón B., Lú-Chau T.A., Moreira M.T., Lerna J.M., Eibes G.: Comprehensive investigation of the enzymatic oligomerization of esculin by laccase in ethanol : water mixtures, RSC Adv 7 (2017) 38424
13. Li C.X., Li J.C., Lai J., Liu Y.: The pharmacological and pharmacokinetic properties of esculin: A comprehensive review. Phytother Res (2022) 36 2434 – 2448
14. Tian L., Cao J., Zhao T., Liu Y., Khan A., Cheng G.: The bioavailability, extraction, biosynthesis and distribution of natural dihydrochalcone: phloridzin. Int J Mol Sci 22(2021) 962
15. Baldisserotto A., Malisardi G., Scalambra E., Andreotti E., Romagnoli C., Vicentini C.B., Manfredini S., Vertuani S.: Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications. Molecules 17 (2012) 13275 – 13289
16. Bartosova L., Bajgar J.: Transdermal Drug Delivery *In Vitro* Using Diffusion Cells. Current Medicinal Chemistry 19 (2012) 4671–4677.
17. Palomo J.M.: Nanobiohybrids: a new concept for metal nanoparticles synthesis. Chemical Communications 55 (2019) 9583.

3. Полазне хипотезе

Флавоноиди представљају групу фенолних једињења чији бенефити за људско здравље се проучавају и познати су већ деценијама па налазе све већу примену у мноштву прехранбених, козметичких и фармацеутских производа. Такође, многобројна истраживања су доказала повезаност између бенефита по људско здравље различитих биљних екстраката и присуства флавоноида у овим екстрактима. Физиолошки ефекти ове групе јединица се манифестују као антимикробне, антивирусне, антиинфламаторне, антиоксидативне и антиинфламаторне активности. Познато је да врста и интензитет физиолошке активности зависи од хемијске структуре флавоноида, како од присуства, броја и распореда појединих хидроксилних група у агликону, тако и од састава и степена полимеризације угљенохидратне фракције молекула. Из овог разлога се различитим видовима модификације хемијског састава флавоноида (гликозиловање, естерификација, хидролиза угљенохидратне компоненте, полимеризација), које се често изводе са примарним циљем побољшања технолошких карактеристика ових једињења, може утицати и на њихову биолошку активност или биорасположивост. У оквиру научне области биохемијско инжењерство и биотехнологија, истраживања фокусирана на модификацију флавоноида су све интензивнија јер су ове модификације катализоване ензимима па захтевају знања из биохемијског инжењерства за оптимизацију процеса модификације, а биотехнолошка експертиза је потребна за биолошку карактеризацију новосинтетисаних молекула и процену њихове физиолошке активности.

Ензимска полимеризација флавоноида се још налазиу фази развоја па се значајна унапређења могу постићи на пољу оптимизације ензимске реакције и идентификације биолошке активности, а тиме и потенцијалне примене ове реакције и нових производа. Досадашња истраживања у овој области су ограничена на неколико флавоноида и није изведена детаљна компаративна анализа која би омогућила сагледавање утицаја структуре полазног флавоноида на принос производа и расподелу величина (степен полимеризације) добијених олигомера. Такође, није на свеобухватан начин испитан утицај најважнијих реакционих фактора на брзину и домашај реакције па се ефикасност добијања

олигомера флавоноида може значајно унапредити детаљном оптимизацијом ове ензимске реакције. Хемизам ове реакције, структура добијених производа и тип везе која настаје при формирању производа су само делимично расветљени, па су подаци који се могу добити детаљном инструменталном анализом производа реакције неопходни. Самим тим није успостављена ни корелација између хемијске структуре и различитих врста биолошке активности који су утврђени за олигомере флавоноида па су паралелна истраживања на хемијској и биолошкој карактеризацији ових производа неопходна.

Основне хипотезе које се могу издвојити као полазна основа за започињање научно-истраживачког рада у оквиру ове дисертације су следеће:

- Олигомери флавоноида су физиолошки активна једињења, са потенцијалном применом као индустријске боје природног порекла у индустрији хране, која се могу добити „зеленим“ ензимским поступком применом лаказа. Оптималан исход ензимског поступка из аспекта приноса и састава финалног производа може се контролисати бољим познавањем механизма и кинетичког модела ове ензимске реакције и утицаја најважнијих реакционих фактора. У почетном делу истраживања у овој дисертацији биће одабран најпогоднији биокатализатор за синтезу олигомера флавоноида, а при избору ће бити разматран утицај на степен конверзије флавоноида и специфичност биокатализатора по питању расподеле степена полимеризације финалног производа. Досадашња истраживања су показала да се ензимским олигомеризацијама постиже доста широка расподела величине добијених олигомера што потенцијално представља високе трошкове касније сепарације биопроизвода па је значајно да се овај параметар контролише током ензимског процеса. Прва хипотеза ове дисертације је да се контрола процеса ензимске олигомеризације може значајно побољшати постављањем поузданог кинетичког модела реакције и оптимизацијом реакционих фактора. Зато ће један део истраживања бити посвећен постављању оптималног кинетичког модела реакције и одређивању кинетичких константи. Ради оптималног и потпуног искоришћења биокаталитичког потенцијала одабраних лаказа биће оптимизовани и услови реакције варирањем најважнијих реакционих фактора (температура, састав растварача, концентрација ензима и концентрација супстрата) у складу са статистичким методама планирања експеримента и одређивање оптималних вредности фактора постављањем регресионог модела и применом методе одзивних површина.
- Механизам ензимске синтезе олигомера флавоноида се заснива на оксидацији почетног супстрата којом се он преводи у форму која може, између осталог, да реагује са другим молекулима флавоноида и формира олигомере. Лаказе се примењују као катализатори ове реакције јер је њихова примарна функција управо да катализују оксидацију фенолних једињења. Друга хипотеза ове дисертације је да овакав механизам реакције указује на могућност примене нових катализатора, бионанохибрида, у овој реакцији. Бионанохидриди представљају наночестице које садрже протеински скелет који у себи садржи јоне метала. Они могу у својој основи имати ензим, али инкорпорирањем метала добијају нова каталитичка својства, као што су способност катализе реакције оксидације различитих супстрата. У оквиру ове докторске дисертације биће испитана могућност примене неколико бионанохибрида, који садрже јоне бакра или мангана, у реакцији синтезе олигомера флавоноида ради идентификовања нових биокатализатора који могу

катализовати ову реакцију и биће упоређена њихова селективност и активност са лаказама.

- Комплексна структура флавоноида омогућава да се реакција оксидације, као први корак у механизму синтезе олигомера, одигра на више различитих места у оквиру молекула. Самим тим, већ је број потенцијалних димера који могу настати у првој реакцији овог процеса значајан, а број потенцијалних производа се рапидно повећава са повећањем степена полимеризације. Досадашња истраживања посвећена детаљној инструменталној анализи ових једињења су ретка и ограничена на два флавоноида. Трећа хипотеза ове дисертације је да су детаљнија сазнања о хемијској структури добијених производа неопходна јер ће омогућити бољу контролу процеса захваљујући бољем познавању механизма реакције, као и боље тумачење добијених биолошких активности производа и различитих фракција производа у фази биолошке карактеризације. Зато ће у оквиру ове дисертације значајан део истраживања бити посвећен хемијској карактеризацији производа, а биће синтетисани олигомери више различитих флавоноида (ескулин, флоридзин, нарингин, рутин). Прва фаза карактеризације биће изведена HPLC-MS анализом која ће омогућити одређивање степена полимеризације различитих производа и дати прелиминарне информације о начину формирања везе на основу моларне масе производа. Детаљна карактеризација биће изведена NMR спектроскопијом након сепарације појединачних производа применом препаративне хроматографије чиме ће бити добијене информације о положају новоформираних веза у молекулу.
- Олигомери флавоноида имају нешто другачије физичко-хемијске карактеристике у односу на полазне супstrate, па се ове промене рефлектују и на њихову биолошку активност. Досадашња истраживања су показала да су понекад биолошке активности непромењене након олигомеризације, али понекад долази до промена. Већина ових истраживања је изведена анализом смеша олигомера различитог степена полимеризације што додатно усложњава тумачење ових резултата и отежава предикцију утицаја модификације флавоноида олигомеризацијом на биолошку активност. Четврта хипотеза ове дисертације је да се биолошком карактеризацијом појединачних фракција производа олигомеризације флавоноида спрегнутом са претходном детаљнијом хемијском карактеризацијом ових једињења може доћи до значајних информација о механизму биолошког дејства олигомера флавоноида и дефинисању корелације између структуре и биолошке активности. Зато ће у оквиру ове дисертације бити изведена анализа антиоксидативне, антимикробне и пребиотске активности која ће омогућити да се сагледа утицај врсте флавоноида и степена полимеризације производа на биолошку активност производа.
- Финални циљ дисертације је постизање значајног доприноса у развоју технолошког процеса производње олигомера флавоноида. Важно ограничење за будућу примену олигомера флавоноида је висока цена комерцијалних лаказа, а у досадашњим истраживањима су примењивани само слободни ензими који се не могу поново употребити. Стога ће последња фаза истраживања бити посвећена примени неколико различитих техника имобилизације ензима на погодне носаче у циљу добијања јефтинијих имобилизованих ензима који катализују реакцију полимеризације флавоноида. Додатно, једна од полазних хипотеза ове дисертације је и да се адекватним избором носача и технике имобилизације може променити

расподела степена полимеризације финалног производа па имобилизација може бити искоришћена и као средство за усмеравање селективности реакције. Зато ће у оквиру истраживања бити примењени и нанобиокатализатори, који ће бити добијени имобилизацијом биокатализатора (лаказа и бионанохибрида) на наночестице силике и наноцелулозу.

4. Научне методе истраживања

Праћење тока реакције синтезе олигомера флавоноида, изоловање производа и карактеризација производа биће вршено савременим инструменталним методама. Концентрација производа биће одређена применом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC) користећи неполярну аналитичку C18 колону, а у зависности од синтетисаног производа, као мобилна фаза биће коришћена смеши метанол/вода. Иста метода биће употребљена и у циљу изоловања и пречишћавања производа, и то применом семи-препаративне RP-HPLC са колектором. У оба случаја производ ће бити детектован помоћу UV детектора. У циљу одређивања степена полимеризације добијених производа биће примењена HPLC-MS техника, а за одређивање типа и положаја новоформиране везе у олигомеру биће примењена NMR спектроскопија. За планирање експеримента, статистичку анализу и интерпретацију добијених резултата биће коришћен софтверски пакет Stat Ease Design Expert, као и програмски пакет MATLAB. У циљу одређивања антиоксидативне активности, примењиваће се спектрофотометријске методе (ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC). Ток имобилизације и активност имобилисаног биокатализатора биће одређиване спектрофотометријским методама одређивања концентрације протеина и активности лаказе, а најефикаснији имобилисани ензими биће тестирани у реакцијама олигомеризације у шаржном реактору.

5. Очекивани научни допринос

Очекује се да ће резултати до којих се дође у оквиру ове дисертације дати значајан научни допринос развоју ензимских поступака за добијање олигомера флавоноида и дефинисању њихове хемијске структуре и биолошке активности са циљем дефинисања области примене. У оквиру истраживања може се очекивати неколико основних доприноса:

- Биће развијен оригиналан ензимски поступак добијања олигомера флавоноида, што подразумева неколико појединачних доприноса:
 - избор погодног реакционог медијума и биокатализатора,
 - оптимизацију најважнијих процесних параметара и одређивање кинетичког модела,
 - развој имобилисаних ензима који се могу применити у синтези олигомера флавоноида,
 - контролисање расподеле величине добијених олигомера адекватним избором биокатализатора и вођењем реакције.
- Биће изведена хемијска и биолошка карактеризација добијених производа олигомеризације флавоноида, што укључује неколико доприноса:
 - биће одређена расподела величина добијених олигомера у реакцијама са различитим флавоноидима,
 - биће остварен значајан допринос у идентификацији структуре добијених олигомера одређивањем типа и положаја новоформиране хемијске везе,

- биће одређене биолошке активности (антиоксидативна, антимикробна и пребиотска) појединачних олигомерних фракција,
- биће постигнут значајан допринос у успостављању корелације између биолошке активности молекула и хемијске структуре (врсте полазног флавоноида, степена полимеризације и типа везе).

Поред набројаног, резултати ове дисертације ће дати значајан научни допринос развоју бионанохибрида и проналажењу нових области примене ових нових биокатализатора.

6. План истраживања и структура рада

Предмет истраживања ове дисертације је развој ензимског поступка синтезе олигомера флавоноида помоћу слободних и имобилисаних лаказа микробног порекла и бионанохибрида, као и хемијска и биолошка карактеризација ради процене могућности примене синтетисаних олигомера у прехранбеним, козметичким и фармацеутским производима. Током израде дисертације биће испитан утицај врсте флавоноида на кинетику реакције, принос производа и расподелу величине производа, као и на механизам реакције и биолошку активност добијених производа.

Предвиђа се да ће у докторској дисертацији бити обрађена следећа поглавља: *Увод*, *Теоријски део*, *Експериментални део*, *Резултати и дискусија*, *Закључак*, *Литература*.

У поглављу *Увод* биће дефинисани основни циљеви и предмет истраживања, као и допринос дисертације.

Теоријски део докторске дисертације обухватиће преглед и анализу доступне литературе која се односи на:

- Хемијску структуру и физиолошку активност флавоноида,
- Својства лаказа од значаја за производњу олигомера флавоноида и методе њихове имобилизације,
- Добијање и примену бионанохибрида,
- Ензимску синтезу олигомера полифенолних једињења и испитивање њихове биолошке активности.

У *Експерименталном делу* биће наведени примењени материјали и методе, конкретније:

- Хемикалије и материјали употребљени у раду,
- Методе за одређивање ензимске активности,
- Методе за имобилизацију ензима,
- Инструменталне методе за одређивање структуре олигомера флавоноида,
- Методе за одређивање биолошке активности олигомера флавоноида.

У поглављу *Резултати и дискусија* биће представљени и дискутовани резултати избора биокатализатора, оптимизације услова ензимског поступка и испитивања кинетике синтезе олигомера флавоноида из аспекта максималног искоришћења потенцијала биокатализатора и контроле ензимске реакције са циљем добијања производа оптималног степена полимеризације. Резултати хемијске и биолошке карактеризације олигомера флавоноида биће представљени и дискутовани из аспекта анализе утицаја карактеристика полазног флавоноида на хемијску структуру олигомерног производа и утицаја хемијских карактеристика производа на различите видове биолошке активности.

У *Закључку* ће резултати добијени у току истраживања бити сумирани уз стављање акцента на њихове научне доприносе, иновативност и будућу примену.

Литература ће садржати наводе цитиране у дисертацији и публикације проистекле из истраживачког рада у оквиру ове дисертације.

7. Закључак и предлог

На основу података о досадашњем раду и постигнутим резултатима, Комисија сматра да кандидат Ана Вукоичић, мастер инжењер технологије, испуњава све услове за рад на предложеној докторској дисертацији. Комисија сматра да је тема докторске дисертације под насловом „Ензимска синтеза олигомера флавоноида и хемијска и биолошка карактеризација“ (“Enzymatic synthesis of flavonoid oligomers and chemical and biological characterization”) научно заснована и да ће представљати значајан допринос у ужој научној области Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду матична установа. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да кандидату Ани Вукоичић одобри израду ове докторске дисертације. За ментора докторске дисертације Комисија предлаже др Дејана Безбрадицу, редовног професора Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 14.11.2023.

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 Светлана Грујић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Соња Јаковетић Танасковић, доцент
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....
Др Љубодраг Вујисић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Хемијски факултет