

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
 FAKULTET: PRIRODNO-MATEMATIČKI



РЕПУБЛИКА СРПСКА  
 УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
 Природно-математички факултет  
 Број: 19-3629/18  
 Датум: 13. 11. 2018. год.  
 БАЊА ЛУКА

**IZVJEŠTAJ**  
*o ocjeni urađene doktorske disertacije*

**I PODACI O KOMISIJI**

1) Nastavno-naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci je na sjedinici održanoj 24.10.2018. godine donijelo Odluku broj 19/3.3419/18 kojom je imenovalo Komisiju za pregled, ocjenu i odbranu urađene doktorske disertacije. Komisija je trebala da napiše Izvještaj o ocjeni urađene doktorske disertacije "Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama", kandidatkinje mr Jovane Glušac

2) Komisija:

- dr Zoran Kukrić redovni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Tehnološki fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, predsjednik
- dr Siniša Škondrić, docent, uža naučna oblast: Biljne nauke, botanika, Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, član
- dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Banjoj Luci, mentor-član

1) Navesti datum i organ koji je imenovao komisiju;

2) Navesti sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, naučno-nastavnog zvanja, naziva uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje i naziva univerziteta/fakulteta/instituta na kojem je član komisije zaposlen.

**II PODACI O KANDIDATU**

1) Jovana, Rodoljub, Glušac

2) 21.09.1981. godine, Sanski Most, Bosna i Hercegovina

3) Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija, magistar bioloških nauka

4) Prirodno-matematički fakultet, „Promjene u antioksidativnom metabolizmu lista čuvarakuće (*Sempervivum tectorum* L.) indukovane teškim metalima i sušom“, Biološke nauke, 24.12.2011. godine

5) Biološke nauke

6) Postupak za sticanje naučnog stepena doktora nauka započet je 2015. godine, prema odredbama člana 148. Zakona o visokom obrazovanju, Studijski program: Biologija

1) Ime, ime jednog roditelja, prezime;

- 2) Datum rođenja, opština, država;
- 3) Naziv univerziteta i fakulteta i naziv studijskog programa akademskih studija II ciklusa, odnosno posljediplomskih magistarskih studija i stečeno stručno/naučno zvanje;
- 4) Fakultet, naziv magistarske teze, naučna oblast i datum odbrane magistarskog rada;
- 5) Naučna oblast iz koje je stečeno naučno zvanje magistra nauka/akademsko zvanje mastera;
- 6) Godina upisa na doktorske studije i naziv studijskog programa.

### III UVODNI DIO OCJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

- 1) „Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama”
- 2) 16.07.2015. Senat Univerziteta u Banjoj Luci (Odluka broj: 02/04-3.2305-88/15)
- 3) Poglavlje „UVOD” je napisano na dvije stranice (str. 1 i 2) i sadrži kratak osvrt, te definicije i opise osnovnih karakteristika oksidoreduktaznih enzima peroksidaza i tirozinaza, mehanizme umrežavanje proteina koji su katalizovani peroksidazama i tirozinazama, te doprinos i značaj ovakvih istraživanja u cilju dobijanja boljeg uvida u protein-protein interakcije, kao i kreiranje novih životno važnih proizvoda u oblasti biohemije i biotehnologije koji su predmet istraživanja doktorske disertacije. Poglavlje „CILJ ISTRAŽIVANJA” je napisan na jednoj stranici (str. 3) i sadrži jasno formulisane ciljeve istraživanja. Kandidatkinja je u poglavlju „PREGLED LITERATURE” (13 stranica; str. 4-16), koje sadrži šest potpoglavlja, sažeto i jasno opisala biohemijske karakteristike (strukturu, lokalizaciju u ćeliji, specifičnost za supstrate i druge važne karakteristike) oksidoreduktaza: peroksidaza (str. 4-6) i tirozinaza (str. 7-8), te tirozinaza iz *Bacillus megaterium* (str. 8-9). Predstavljen je literaturni pregled o umrežavanju proteina (str. 10-11), te umrežavanju proteina koje je katalizovano peroksidazama i tirozinazama (str. 11-15). Opisani su model proteini koji su odabrani za umrežavanje katalizovano peroksidazama i tirozinazama (str. 15-17). Poglavlje „MATERIJAL I METODE RADA” (20 stranica; str. 17-36) sadrži dva potpoglavlja „Materijal” i „Metode”. Potpoglavlje „Materijal” ima šest manjih potpoglavlja gdje su navedene sve korištene hemikalije (str. 17), uslovi gajenja biljaka (str. 17), bakterijski soj i vektor (str. 18), antibiotici (str. 18), medijumi za rast (str. 18-19), priprema pufera i rastvora (str. 19-23). Potpoglavlje „Metode” ima deset manjih potpoglavlja gdje su opisane sve metode koje su korištene u radu. Opisan je proces prečišćavanja peroksidaza i tirozinaza iz korijena pasulja i kukuruza (str. 24-26). Detaljno su opisane metode za karakterizaciju izolovanih peroksidaza i tirozinaza iz biljnog materijala (str. 27-30), kao što su određivanje koncentracije proteina (str. 31-32), aktivnosti enzima, enzimska kinetika, suspratne specifičnosti, te maseno spektroskopske (LC-MS/MS) analize peroksidaznih i tirozinaznih ekstrakta (str. 32-33). Dat je opis metoda za razdvajanje (nativna elektroforeza) i detektovanje izoformi enzima: peroksidaze i tirozinaze (str. 29-30), kao i metoda za SDS-PAGE elektroforezu (str. 32). Opisani su procesi prečišćavanja i izolovanja model proteina: krompira i kukuruza (zein) (str. 33-34). Detaljno su opisane metode ispitivanja sposobnosti prečišćenih enzima iz korijena kukuruza i pasulja u umrežavanju proteina krompira (str. 34-35). Opisan je postupak dobijanja rekombinantnog enzima tirozinaze iz *Bacillus megaterium* (str. 30-31). Takođe, opisane su metode za ispitivanje sposobnosti rekombinantnog enzima da umrežava model proteine krompira, kukuruza (zein) i graška (str. 35-36). Posljednje potpoglavlje u poglavlju „Materijal i metode rada” opisuje program korišten za statističku obradu dobijenih rezultata. Poglavlje „REZULTATI I DISKUSIJA” (48 stranica; str. 37-84) sadrži pregled dobijenih rezultata koji su predstavljeni tabelarno, grafički i kao slike gelova. Poglavlje ima dva potpoglavlja: „Izolacija i karakterizacija enzima” i „Enzimatski katalizovano umrežavanje model proteina”. U okviru prvog potpoglavlja dati su rezultati izolacije i karakterizacije

peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja (str. 37-39), rezultati proteomiks analize (LC-MS/MS) enzimskih ekstrakta (str. 39-45), rezultati enzimske kinetike i supstratne specifičnosti enzima (str. 50-57), kao i slike gelova sa razdvojenim enzimskim izoformama (str. 45-49). Predstavljani su rezultati prečišćavanja tirozinaze iz *Bacillus megaterium* (str. 58-59). U drugom potpoglavlju predstavljani su rezultati izolacije model proteina: proteina krompira (str. 60-62), proteina kukuruza (zein) (str. 77-78) i opisani su komercijalni koncentracije proteina graška (str. 81-82). Određene su koncentracije proteina i prikazani su proteinski profili na gelovima. Prikazani su rezultati umrežavanja proteina krompira sa peroksidazama iz korijena kukuruza i pasulja, kao i rezultati umrežavanja dobijeni kada je korištena komercijalna peroksidaza iz hrena (str. 62-71). Prikazani su rezultati umrežavanja proteina krompira (str. 71-76), zeina (str. 78-80) i proteina graška (str. 82-84) sa tirozinazom iz *Bacillus megaterium*. Rezultati umrežavanja su prikazani kao gelovi i upoređeni sa literaturnim podacima. Svi dobijeni rezultati su upoređeni sa relevantnim literaturnim podacima.

Poglavlje „ZAKLJUČAK” (tri stranice; str. 85-87) sadrži pravilno i sistemski navedene zaključke ovog istraživanja, uz jasno navođenje njihovog teorijskog i praktičnog značaja za ispitivanu oblast.

Poglavlje „LITERATURA” (13 stranica; str. 88-100) sadrži 168 abecedno navedenih korištenih referenci.

U numeraciju nisu uključeni „Rezime” i „Summary”, dati na početku rada, poslije naslovnih strana na srpskom i engleskom jeziku, koji adekvatno predstavljaju proširen sažetak ove doktorske disertacije na srpskom i engleskom jeziku.

Takođe, bez uključivanja u numeraciju slijede „Zahvalnica” i „Sadržaj”, prije poglavlja „UVOD”, kao i „Biografija autora” i tri „Izjave” koje su na kraju rada poslije poglavlja „LITERATURA”.

4) Disertacija sadrži 100 numerisanih stranica računarski obrađenog teksta, 7 tabela i 46 slika. Citirane su 168 reference. Disertacija obuhvata sedam poglavlja: Uvod, Cilj istraživanja, Pregled literature, Materijal i metode rada, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura.

1) Naslov doktorske disertacije;

2) Vrijeme i organ koji je prihvatio temu doktorske disertacije

3) Sadržaj doktorske disertacije sa straničenjem;

4) Istaći osnovne podatke o doktorskoj disertaciji: obim, broj tabela, slika, šema, grafikona, broj citirane literature i navesti poglavljia.

#### IV UVOD I PREGLED LITERATURE

1) Primjena peroksidaza i tirozinaza u različitim biohemijskim i biotehnološkim procesima otvara potrebe za njihovim intenzivnim izučavanjem, kao i traženje novih izvora ovih enzima u živom svijetu. Stoga, prvi cilj je usmjeren ka djelimičnom prečišćavanju i biohemijskoj karakterizaciji enzima peroksidaza i tirozinaza u korijenu kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.). Upravo primjena peroksidaza i tirozinaza će zavisiti od poznavanja strukturnih i biohemijskih karakteristika ovih enzima. Umrežavanje (eng. *cross-linking*) jeste stvaranje jonske ili kovalentne veze između dva polimerna lanca. U biološkom kontekstu, umrežavanje predstavlja reakciju u kojoj se dvije molekule spajaju, a njihova interakcija predstavlja težište istraživanja. Umrežavanje proteina se može postići korištenjem različitih enzima i obično se ostvaruje preko određenih amino kiselina u proteinima (glutamina, lizina, tirozina i cisteina) ili ugljenih hidrata. Poznato je da globularni proteini teško podliježu enzimski katalizovanom umrežavanju. Drugi cilj istraživanja je usmjeren ka određivanju sposobnosti enzima peroksidaza (POX, EC 1.11.1.7) iz biljnog tkiva i tirozinaza (EC 1.14.18.1) iz *Bacillus megaterium* (TyrBm) za *cross-linking* odabranih model proteina: proteina krompira,

hidrofobnog proteina kukuruza (zeina) i proteina graška.

2) Umrežavanje proteina se definiše kao "proces povezivanja proteinskih molekula kroz inter- ili intramolekulske kovalentne veze" (Heck i sar., 2013). Dok se hemijski reagensi, kao što su glutaraldehid ili formaldehid, često koriste za dobijanje kovalentnih veza između proteinskih lanaca, povezivanje posredstvom enzima predstavlja poželjnu alternativu. Velika motivacija za istraživanje i upotrebu enzimskog umrežavanja proistekla je iz brojnih važnih pitanja. Enzimatski proces je obično sigurniji i ima manji uticaj na životnu sredinu u poređenju sa hemijskim procesom, omogućava upotrebu blagih vodenih reakcionih uslova i omogućava smanjenje troškova rada. Takođe enzimski katalizovano umreženje može da se reguliše. Postoje različiti enzimi koji mogu generisati kovalentno umrežavanje proteina i stoga se koriste za različite aplikacije. Ovi enzimi se međusobno razlikuju u smislu reakcionog mehanizma i aminokiselinskih ostataka sa kojima reaguju (Gerrard i sar., 2005; Strong i Claus, 2011; Zeeb i sar., 2017). Najpoznatiji predstavnik peroksidaza Klase III je hren peroksidaza (HRP) (EC 1.11.1.7) koja je najviše korištena u ispitivanju procesa umrežavanja. HRP karakteriše nizak redoks potencijal i sposobnost da katalizuje oksidaciju tirozinskih ostataka u proteinu. Nastali radikali tirozina mogu da indukuju konjugaciju (izo)di-tirozina, posljedica čega je formiranje intramolekularne kovalentne veze (Veitch, 2004; Heijnis i sar., 2011). Pokazano je da peroksidaze mogu da umreže protein gluten i stvaraju kovalentne konjugate između glutena ili  $\beta$ -kazeina i arabinoksilana, odnosno da se arabinoksilani vezuju preko ferulične kiseline za gluten preko ostataka lizina, tirozina ili cisteina (Hilhorst i sar., 1999; Boeriu i sar., 2004). Takođe je pokazano da peroksidaze mogu da umreže proteine kazeina, apo- $\alpha$ -laktoalbumina (Saricay i sar., 2013) i da utiču na parcijalno umrežavanje proteina surutke (Færgemand i sar., 1998; Thalmann i Lötzbeyer, 2002). Različiti parametri kao što je količina dodatog HRP-a, jonska jačina, te koncentracija proteina, mogu kontrolisati oligomerizaciju (Dhayal i sar., 2014). Istraživanja mehanizama umrežavanja su pokazala da peroksidazna reakcija sa  $\alpha$ -laktalbuminom dovodi do formiranja di-tirozina, ali i formiranja oligo-tirozina (Dhayal i sar., 2015).

Tirozinaze su korištene za umrežavanje uglavnom u prisustvu posrednika male molekulske mase (fenoli) kao medijatora za umrežavanje (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017, 2018). Kada je fenol prisutan u reakcionoj smješi, on posredstvom enzima prelazi u reaktivni hinon koji dalje reaguje sa drugim reaktivnim grupama u proteinskom lancu kao što su ostaci hidroksila, sulfhidrila ili amina (Buchert i sar., 2010). Bez dodavanja fenolnog medijatora, umrežavanje će se odvijati preko ostataka tirozina i stepen umrežavanja će zavistiti od dostupnosti ostataka tirozina aktivnom mjestu enzima (Zeeb i sar., 2017; Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017, 2018). Pokazano je da je mješavina tirozinaze i fenola postigla bolji efekat umrežavanja i stabilizaciju nanočestica natrijum-kazeinata, nego kada je primjenjen glutaraldehid (Xu i sar., 2016). Proteini sa višim nivoima organizacije (tercijarnom i kvarternom) teško mogu biti umreženi bez dodavanja molekula male molekulske mase, fenolnih medijatora (Isaschar-Ovdat i Fishman, 2017, 2018).

**Literatura citirana u doktorskoj disertaciji a navedena u ovom dijelu izvještaja:** Boeriu, C. G., Bravo, D., Gosselink, R. J. A., & van Dam, J. E. G. (2004). Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 205-218. Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R., & Kruus, K. (2010). Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1, 113-138. Dhayal, S. K., Gruppen, H., de Vries, R., & Wierenga, P. A. (2014). Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of alpha-lactalbumin with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids*, 36, 53-59. Dhayal, S. K., Sforza, S., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2015). Peroxidase induced oligo-tyrosine cross-links during polymerization of alpha-lactalbumin. *Biochim Biophys Acta*, 12(10), 15. Færgemand, M., Otte, J., & Qvist, K. B. (1998). Cross-Linking of whey proteins by enzymatic oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1326-1333. Gerrard, J. A., Meade, S. J., Miller, A. G., Brown, P. K., Yasir, S. B., Sutton, K. H., & Newberry, M. P. (2005). Protein cross-linking in food. *Ann N Y Acad Sci*, 012. Heck, T., Faccio, G., Richter, M., & Thöny-Meyer, L. (2013). Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and*

*Biotechnology*, 97(2), 461-475. Heijnis, W. H., Dekker, H. L., de Koning, L. J., Wierenga, P. A., Westphal, A. H., de Koster, C. G., Gruppen, H., & van Berkel, W. J. (2011). Identification of the peroxidase-generated intermolecular dityrosine cross-link in bovine alpha-lactalbumin. *J Agric Food Chem*, 59(1), 444-449. Hilhorst, R., Dunnewind, B., Orsel, R., Stegeman, P., Vliet, Gruppen, H., & Schols, H. A. (1999). Baking Performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *Journal of Food Science*, 64: 808-813. Isaschar-Ovdat, S., & Fishman, A. (2017). Mechanistic insights into tyrosinase-mediated crosslinking of soy glycinin derived peptides. *Food Chemistry*, 232, 587-594. Isaschar-Ovdat, S., & Fishman, A. (2018). Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 134-143. Saricay, Y., Wierenga, P., & de Vries, R. (2013). Nanostructure development during peroxidase catalysed cross-linking of  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 280-288. Strong, P. J., & Claus, H. (2011). Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(4), 373-434. Thalmann, C., & Lötzbeyer, T. (2002). Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology*, 214(4), 276-281. Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259. Xu, R., Teng, Z., & Wang, Q. (2016). Development of tyrosinase-aided crosslinking procedure for stabilizing protein nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 60, 324-334. Zeeb, B., McClements, D. J., & Weiss, J. (2017). Enzyme-based strategies for structuring foods for improved functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 21-34.

3) Prečišćene su peroksidaze iz korijena pasulja i kukuruza i po prvi put su istražene sposobnosti solubilnih i jonskih peroksidaza da umrežavaju proteine krompira. Takođe, su po prvi put istražene sposobnosti rekombinantne tirozinaze iz *Bacillus megaterium* u umrežavanju proteina krompira, hidrofobnog proteina kukuruza (zein) i proteina graška. Stoga, doprinos ove disertacije ogleda se u razjašnjavanju mehanizama umrežavanja proteina katalizovano sa peroksidazama i tirozinazama.

4) Očekivani naučni doprinos ove disertacije se odnosi na saznanja o biohemijskim karakteristikama enzima iz odabranih biljnih vrsta što bi dalje pružilo neophodne informacije u oblasti bazničnih nauka i pomoglo u unaprijeđenju kreiranja novih životno važnih proizvoda u oblastima biohemije i biotehnologije. Takođe, očekivani naučni doprinos se ogleda i u procesima izučavanja protein-protein interakcija kroz enzimski katalizovana umrežavanja proteina, sa ciljem dobijanja što kvalitetnijih podataka o strukturi i funkciji proteina, kao i mehanizmima umrežavanja globularnih proteina.

1) Ukratko istaći razlog zbog kojih su istraživanja preduzeta i predstaviti problem, predmet, ciljeve i hipoteze;

2) Na osnovu pregleda literature sažeto prikazati rezultate prethodnih istraživanja u vezi problema koji je istraživan (voditi računa da obuhvata najnovija i najznačajnija saznanja iz te oblasti kod nas i u svijetu);

3) Navesti doprinos teze u rješavanju izučavanog predmeta istraživanja;

4) Navesti očekivane naučne i pragmatične doprinose disertacije.

## V MATERIJAL I METODE RADA

1) Imajući u vidu postavljene ciljeve rada primjenom odgovarajućih eksperimentalnih metoda kandidatkinja je djelimično prečistila i biohemijski okarakterisala dvije frakcije peroksidaza Klase III (POX, EC 1.11.1.7), solubilne i jonski vezane za ćelijski zid iz korijena kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.). Određeni su kinetički parametri ( $K_m$ ) i specifičnost za supstrate, hidrokisicinične kiseline (*p*-kumaričnu, hlorogenu i kafeičnu kiselinu) djelimično prečišćenih peroksidaza. Približne molekulske mase peroksidaza u njihovoj terciarnoj (nativnoj) strukturi utvrđene su modifikovanom SDS elektroforezom. Za razdvajanje POX izoformi korištena je nativna elektroforeza. Dužina aminokiselinske sekvence, pI (izoelektrične tačke) i ostale biohemijske osobine solubilnih peroksidaza iz kukuruza i pasulja detektovane su masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Osnovni kriterijumi su bili usmjereni ka djemičnom prečišćavanju peroksidaza i tirozinaza i ispitivanju sposobnosti umrežavanja proteina, posebno globularnih proteina. Određena je sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, kao što su proteini krompira sa djelimično prečišćenim frakcijama solubilnih i jonski vezanih peroksidaza kukuruza i pasulja. Dinamika i stepen umrežavanja su praćeni SDS-PAGE

analizom. Polifenoloksidaza ili tirozinaze (EC 1.14.18.1) iz korijena kukuruza i pasulja su takođe djelimično prečišćene i okarakterisane. Za umrežavanje proteina korištena je rekombinantna tirozinaza bakterijskog porijekla, izolovana iz *Bacillus megaterium* (TyrBm). Ispitana je sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, već spomenutog proteina krompira, ali i proteina graška i hidrofobnog proteina zeina, izolovanog iz kukuruza sa TyrBm. Za potebe ove disertacije proteini krompira i kukuruza su prečišćeni u laboratoriji i korišteni u daljem radu, dok su kao proteini graška korišteni oni koji su komercijalno dostupni. Svi dobijeni rezultati obrađeni pomoću programa SigmaPlot 11.0. (SigmaPlot 11.0, Systat Software, Inc. USA), Microsoft Office Excell 2007, Image Master Total Lab TL 120 (Nonlinear Dynamics Ltd., Durham, USA) i predstavljeni tabelarno, grafički i kao slike gelova sa razdvojenim izoformama peroksidaza i tirozinaza.

2) Primijenjene metode istraživanja su adekvatne, dovoljno tačne i savremene ako se uzmu u obzir dostignuća u ovom polju istraživanja na globalnom nivou. Ispoštovan je plan istraživanja, koji je dat prilikom prijave doktorske teze. Ispitivani parametri daju dovoljno elemenata za pouzdano istraživanje, a statistička obrada podataka je adekvatna.

1) Objasniti materijal koji je obrađivan, kriterijume koji su uzeti u obzir za izbor materijala;

2) Dati kratak uvid u primijenjeni metod istraživanja pri čemu je važno ocijeniti sljedeće:

1. Da li su primijenjene metode istraživanja adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća na tom polju u svjetskim nivoima;

2. Da li je došlo do promjene u odnosu na plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske teze, ako jeste zašto;

3. Da li ispitivani parametri daju dovoljno elemenata ili je trebalo ispitivati još neke, za pouzdano istraživanje;

4. Da li je statistička obrada podataka adekvatna.

## VI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

1) Peroksidaze klase III (POX, EC 1.11.1.7), solubilne i jonski vezane za ćelijski zid iz korijena kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) djelimično su prečišćene i biohemijски okarakterisane. Rezultati masene spektrometrije pokazali su prisustvo 18 solubilnih POX u korijenu kukuruza sa molekulskim masama u opsegu od 33,1-38,7 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 6,06-8,90. Kod pasulja je detektovano 5 POX sa molekulskim masama od 35,2-38 kDa i sa pI vrijednostima u opsegu od 5,08-8,75. Dužina aminokiselinske sekvence solubilnih peroksidaza kukuruza dobijena LC-MS/MS bila je od 320-367 aminokiselina, dok je za solubilne peroksidaze pasulja dužina lanca bila u opsegu od 329-348, što je uobičajena dužina polipeptidnih lanaca Klase III sekretornih peroksidaza. Nativnom elektroforezom detektovano je pet peroksidaznih izoformi u solubilnoj proteinskoj frakciji korijena pasulja i tri peroksidazne izoforme u jonski vezanoj frakciji za ćelijski zid pasulja. U solubilnoj proteinskoj frakciji korijena kukuruza detektovano je osam POX izoformi, a u frakciji vezanoj za ćelijski zid četiri POX izofome. Prema vrijednostima  $K_m$ , sve peroksidaze su pokazale niži afinitet za pirogalol, nego za  $H_2O_2$ , naročito frakcije POX izolovane iz pasulja. Kada je  $H_2O_2$  korišten kao supstrat, vrijednosti  $K_m$  se nisu razlikovale između solubilnih i jonskih POX, za obje biljke. Najveća supstratna specifičnost izmjerena je sa kafeičnom kiselinom i za solubilne i za jonske peroksidaze, pasulja i kukuruza.

Drugi cilj ove disertacije bio je ispitati sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla, kao što su proteini krompira, sa solubilnim i jonskim peroksidazama kukuruza i pasulja. Umrežavanje je bilo moguće u prisustvu solubilnih peroksidaza, kukuruza i pasulja, sa dodatkom i bez dodatka  $H_2O_2$ . Pokazano je da su fenolna jedinjenja iz ekstrakta peroksidaza kukuruza i pasulja poslužila kao medijator u reakciji umrežavanja proteina krompira. Jonski vezane peroksidaze za ćelijski zid pokazale su slabiju sposobnost umrežavanja proteina krompira. Polifenoloksidaza ili tirozinaze (EC 1.14.18.1) iz korijenja kukuruza i pasulja su takođe djelimično prečišćene i okarakterisane. LC-MS/MS analiza je



pokazala odsustvo tirozinaza iz solubilnog proteinskog ekstrakta korijena pasulja, dok su u solubilnom proteinskom ekstraktu korijena kukuruza detektovane dvije polifenoloksidaze sa niskom stepenom sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci. Ispitana je sposobnost umrežavanja proteina biljnog porijekla sa rekombinantnom tirozinazom bakterijskog porijekla, izolovanom iz *Bacillus megaterium* (TyrBm). Za razliku od djelimično prečišćenih peroksidaza, TyrBm nije umrežio patatin, dok su proteini krompira manje molekulske mase bili umreženi i predstavljaju dobre supstrate za TyrBm. TyrBm je pokazao dobru sposobnost umrežavanja hidrofobnog proteina kukuruza (zeina) u alkalnoj sredini, što je posljedica velikog broja tirozinskih ostataka u zeinu i dobre dostupnosti ostataka aktivnom centru tirozinaze. Proteini graška bili su umreženi sa TyrBm, posebno proteinske frakcije vicilina i konvicilina, kao i frakcije sa malim molekulskim masama. Iako proteini graška imaju manje tirozinskih rezidua, bili su bolji supstrati za TyrBm u odnosu na proteine krompira.

2) Dobijeni rezultati su jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, poređeni sa rezultatima drugih autora, uz kritički pristup od strane kandidatkinje.

3) Osim prečišćavanja i izolovanja peroksidaza i tirozinaza iz korijena kukuruza i pasulja, došlo se do novih saznanja u biohemijskoj karakterizaciji navedenih enzima. Teorijski doprinos sprovedenih istraživanja ogleda se u činjenici da se po prvi put pokazalo da je globularni protein, kao što je patatin umrežen sa peroksidazama iz kukuruza i pasulja, dok je umrežavanje sa tirozinazom iz *Bacillus megaterium* izostalo, što zapravo ukazuje na drugačiji mehanizam umrežavanja proteina sa dva različita oksidoreduktazna enzima. Uprkos činjenici da patatin ima 16 tirozinskih ostataka, većina tirozinskih ostataka je smještena u unutrašnju strukturu proteina, te je umrežavanje sa tirozinazom bilo otežano, dok su peroksidaze umrežile protein. Važno je napomenuti da peroksidaze u prisustvu fenolnih medijatora mogu da umrežavaju proteine i preko lizinskih i cisteinskih ostataka, a s obzirom da patatin ima 20 lizinskih ostataka, intenzivno umrežavanje patatina moglo je nastati i preko lizina, a ne samo tirozina. Stoga, na osnovu dobijenih rezultata, predložena su dva mehanizma za umrežavanje patatina sa solubilnim peroksidazama iz korijena pasulja i kukuruza u odsustvu fenolnog medijatora i u prisustvu fenolnog medijatora. Mehanizam umrežavanja patatina u odsustvu fenolnog medijatora vjerovatno se vrši preko hidroksilacije tirozinskih ostataka u reaktivne hinonske oblike i na taj način se stvara reaktivna grupa za reakciju umrežavanja proteina krompira. U prisustvu fenolnog medijatora, mehanizam umrežavanja patatina se vjerovatno dešava preko oksidovanog fenolnog molekula i aaminskog ostatka u patatinu.

U slučaju rekombinantne tirozinaze (TyrBm), čak je i hidrofobni protein - zein umrežen, kao i proteini graška što može znatno uticati na strukturne osobine proteina i na taj način proširiti njihovu aplikaciju. Praktični doprinos ovih istraživanja ogleda se u mogućnosti korištenja dobijenih rezultata za unaprijeđenje i kreiranje novih proizvoda u različitim sferama života. Postoje različiti mehanizmi pomoću kojih se stvaraju umrežavanja što zavisi od aminokiselinske sekvence, okolnih uslova kao i od strukture proteina. Efekat tih umrežavanja je složen i može se balansirati i kontrolisati kako bi se dobili željeni kvaliteti. Ukratko, ova studija je istakla nove mogućnosti i potencijal u korišćenju peroksidaza i rekombinantne tirozinaze kao biotehnoške pomoći u umrežavanju proteina i predstavlja zamjenu za nepoželjne hemijske reagense u umrežavanju proteina, kao što su glutaraldehid ili formaldehid. Enzimski katalizovano umrežavanje globularnih proteina omogućava i dodatni uvid u protein-protein interakciju, stoga dobijeni rezultati mogu biti korisni kako za prečišćavanje peroksidaza iz korijena kukuruza i pasulja, tako i za aplikacije u modifikaciji biofizičke strukture proteina, putem reakcija enzimski katalizovanog umrežavanja i mogu naći dalju primjenu u oblastima biohemije, prehrambenog inženjerstva i biotehnologije. Ova doktorska disertacija je dobar primjer da fundamentalna istraživanja mogu da doprinesu razvoju novih praktično primjenjenih proizvoda.

1) Ukratko navesti rezultate do kojih je kandidat došao;

- 2) Ocjeniti da li su dobijeni rezultati jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora i da li je kandidat pri tome ispoljavao dovoljno kritičnosti;
- 3) Posebno je važno istaći do kojih novih saznanja se došlo u istraživanju, koji je njihov teorijski i praktični doprinos, kao i koji novi istraživački zadaci se na osnovu njih mogu utvrditi ili nazirati.

## VII ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

1) Naučna vrijednost ove doktorske disertacije se ogleda u njenom doprinosu u razvoju naučne oblasti Bioloških nauka, što dokazuju i četiri naučna rada sa prvim autorstvom proizišla iz aktivnosti na izradi ove doktorske disertacije, a publikovana u naučnim časopisima koji su indeksirani u renomiranim citatnim bazama (SCI) za navedenu naučnu oblast sa impakt faktorom.

2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije Komisija predlaže da se doktorska disertacija pod nazivom "Biohemijaska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama", prihvati, a kandidatkinji mr Jovani Glušac odobri odbrana.

1) Navesti najznačajnije činjenice što tezi daje naučnu vrijednost, ako iste postoje dati pozitivnu vrijednost samoj tezi;

2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije komisija predlaže:

- da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana,
- da se doktorska disertacija vraća kandidatu na doradu (da se dopuni ili izmijeni) ili
- da se doktorska disertacija odbija.

## POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

Datum: 13.11.2018

1. Zoran Kukrić  
 dr Zoran Kukrić redovni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, predsjednik

2. Siniša Škondrić  
 dr Siniša Škondrić, docent, uža naučna oblast: Biljne nauke, botanika, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, član

3. Biljana Kukavica  
 dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, mentor-član

IZDVOJENO MIŠLJENJE: Član komisije koji ne želi da potpiše izvještaj jer se ne slaže sa mišljenjem većine članova komisije, dužan je da unese u izvještaj obrazloženje, odnosno razlog zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.



