



IZVJEŠTAJ

*o ocjeni podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske teze*

PODACI O KOMISIJI

Na osnovu člana 149. tačka (1) odluke Zakona o viskom obrazovanju Nastavno – naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta na 161. Sjednici donijelo je odluku br. 19/3.219/15 kojom je imenovana je komisija za ocjenu podobnosti teme za izradu doktorske disertacije pod nazivom „**Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama**“ i uslova kandidata mr Jovane Glušac za njenu izradu, u sljedećem sastavu:

1. dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, (uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija) – predsjednik,
2. dr Danijela Kojić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, (uža naučna oblast: Biohemija) – član.
3. dr Siniša Škondrić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, (uža naučna oblast: Biljne nauke, botanika) – član.

1. BIOGRAFSKI PODACI, NAUČNA I STRUČNA DJELATNOST KANDIDATA

➤ Biografski podaci

Jovana Glušac je rođena 21.09.1981. godine u Sanskom Mostu. Osnovnu školu i Gimnaziju je završila u Prijedoru. Na Prirodno-matematičkom fakultetu u Banjoj Luci diplomirala je 2007. godine, na Odsjeku Biologija, sa opštim uspjehom tokom školovanja 8,04 i stekla zvanje diplomirani biolog.

Školske 2008/09 godine je upisala magistarske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, Studijski program Biologija, smjer Ekologija. Postdiplomske studije završila je 2011. godine, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Banjoj Luci, odsjek Biologija, smjer Ekologija iz oblasti biohemije biljaka i stekla akademski naziv magistra bioloških nauka. U periodu od 13.6. do 25.7.2011. obavljala je stručnu studijsku praksu (IAESTE) u laboratoriji profesora Mr Dariusz Nowak-a (Odsjek za eksperimentalnu fiziologiju, Medicinski Univerzitet u Lođu, Poljska).

Od marta 2008. godine zaposlena je na Visokoj medicinskoj školi u Prijedoru kao asistent na predmetu Medicinska ekologija i stručni saradnik u Laboratoriji za Sanitarnu hemiju. Tokom rada u Visokoj medicinskoj školi učestvovala je u istraživanjima iz oblasti Prehrambene tehnologije (fermentisani mliječni proizvodi, probiotici, funkcionalna hrana) i koautor je više naučnih radova.

➤ Bibliografski podaci

Originalni naučni radovi u časopisu međunarodnog značaja

1. Bialasiewicz, P., Prymont-Przyminska, A., Zwolinska, A., Sarniak, A., Wlodarczyk, A., Krol, M., **Glušac, J.**, Nowak, P., Rutkowski, PK., Markowski, J., Nowak, D. (2014) Addition of strawberries to the usual diet decreases resting chemiluminescence of fasting blood in healthy subjects - possible health promoting effect of these fruits consumption. *Journal of the American College of Nutrition*, 33: 274-287.
2. **Glušac, J.**, Morina, F., Veljović-Jovanović, S., Boroja, M., Kukavica, B. (2013) Changes in the antioxidative metabolism induced by drought and Cd excess in the leaves of houseleek (*Sempervivum tectorum* L.). *Fresenius Environmental Bulletin*, 22:1770-1778.
3. Stijepić, M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D., Pešić-Mikulec, D. (2013) Physicochemical characteristics of soy probiotic yogurt with inulin addition during the refrigerated storage. *Romanian Biotechnological Letters*, 18: 8077-8085.
4. Stijepić, M., Milanović, S., Djurdjević-Milošević, D., Djurić, M., **Glušac, J.**, Kanurić, K., Vukić, V. (2012) Effects of honey and whey protein concentrate addition on textural and sensory properties of probiotic yoghurt. *Milchwissenschaft - Milk Science International*, 67: 277-280.
5. Đurđević-Milošević, D.M., Šolaja, M.M., Topalić-Trivunović, Lj.N., Stijepić M.J., **Glušac J.R.**, (2011) The survival of *Escherichia coli* upon exposure to irradiation with non-coherent polychromatic polarized light, *Veterinarni Medicina*, 56:520-527.
6. Stijepić, M., S. Milanović, **J. Glušac**, V. Vukić, K. Kanurić, D. Đurđević-Milošević, M. Ranogajec, (2011) Effects of selected factors on rheological and textural properties of probiotic yoghurt. *Mljekarstvo* 61:92-101.

Originalni naučni radovi u časopisu nacionalnog značaja

1. Đurđević Milošević, D. Kalaba, V., Kostić, A., Nikolić, M., Stijepić M., **Glušac, J.**, (2014) Procena proširene merne nesigurnostipri određivanju broja kulturabilnih mikroorganizama u vodi. *Veterinarski žurnal Republike Srpske – Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 14:108-117.
2. Stijepić M., Đurđević Milošević, D., **Glušac, J.** (2012) Production of low fat yoghurt enriched with different functional ingredients, *QUALITY OF LIFE* 3:5-12. <http://www.qol-au.com/node/75> (Journal is indexed in: EBSCO Publishing Inc.)
3. Stijepić M., Milanović, S., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2013) Primjena različitih dodataka u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda. *Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi* 24: 29-36. <http://www.tf.uns.ac.rs/publikacije/prehrambena-industrija-2013.pdf>
4. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2013) Effect of honey addition on rheological properties of probiotic soy yoghurt. *Gl. Hem i Teh RS* 9: 29-35
5. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2012) Rheological and sensory properties of probiotic yoghurt made of cows, goats and soymilk enriched with inulin. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 23:13-19.
6. Stijepić M., Đurđević Milošević, D., **Glušac, J.** (2012) Uticaj dodatka meda i koncentrata proteina surutke na viskozitet jogurta. *Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik*. 18:185-193. <http://www.pkbac.rs/zbornici.html>

7. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2011) Fizičko-hemijska i senzorska svojstva probiotičkog jogurta sa dodatkom inulina. Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi, 22:29-34.
8. Stijepić M., Milanović, S., **Glušac, J.**, Vukić, V., Kanurić, K., Đurđević-Milošević, D. (2010) Promjene teksturalnih i senzorskih osobina probiotičkog jogurta proizvedenog uz primjenu različitih dodataka. Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi, 21:103-108. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?artid=0353-65641002103S>
9. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2010) Reološke osobine probiotičkog jogurta sa dodatkom inulina. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik. 16:211-216. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?artid=0354-13201004211S>
10. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2009) Uticaj dodatka koncentrata proteina surutke na reološke i senzorske osobine čvrstog jogurta. Veterinarski žurnal Republike Srpske – Veterinary Journal of Republic of Srpska, 9:131-137.
11. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2009) Probiotičko djelovanje meda na fermentaciju i svojstva kravljeg i kozjeg probiotičkog jogurta. Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi, 20:116-122. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?artid=0353-65640902116S>
12. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2009) Uticaj sadržaja inulina i toplotnog tretmana mleka na sinerezu probiotičkog kozjeg napitka tokom čuvanja. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik. 15:129-135. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?artid=0354-13200904129S>
13. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2009) Uticaj dodatka surutke u prahu na promjene kiselosti probiotičkog kravljeg napitka tokom dugotrajnog čuvanja, Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske 1:113-119.
14. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2009) Promjena viskoziteta tokom skladištenja probiotičkog kravljeg napitka sa dodatkom surutke u prahu, Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske 1:119-125.
15. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2008) Uticaj odabranih faktora na viskozitet tečnog kozjeg jogurta pri konstantnoj brzini rotacije spindla. Veterinarski žurnal Republike Srpske – Veterinary Journal of Republic of Srpska, 8:153-159.
16. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2008) Uticaj temperature termičke obrade svježeg kozjeg mlijeka i dodataka inulina na kvalitet probiotičkog jogurta. Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi, 19:47-53. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?artid=0353-65640802047S>

**Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja štampan u cjelini**

1. Đurđević-Milošević D., Kalaba V., Kostić A., Nikolić A., Stijepić M., **Glušac J.** (2014) Comparison of two microbiological methods after swabbing in surface hygiene control. II International Congress "Food Technology, Quality and Safety", Institute of Food Technology in Novi Sad, University of Novi Sad, Serbia, 28-30.10.2014. Proceedings, 78-83.
2. Kalaba V., Marijanovic Balaban Z., Stijepić M., **Glušac J.**, Kalaba D. (2014) Antimicrobial activity of selected essential oils against *Staphylococcus aureus* compared with antimicrobial drugs. II International Congress "Food Technology, Quality and Safety", Institute of Food Technology in Novi Sad, University of Novi Sad, Serbia, 28-30.10.2014. Proceedings, 434-440.
3. **Glušac J.**, Janjić N., Morina F., Veljović-Jovanović S., Boroja M., Kukavica B. (2013) Anatomical changes in *Sempervivum tectorum* L. leaves after long term

cadmium toxicity and soil-drought exposure. INTERNATIONAL conference NEWENVIRO (2012; Sremska Kamenica). Proceedings of the International Conference, NEWENVIRO, New approaches for assessment and improvement of environmental status in Balkan region: interactions between organisms and environment, Sremska Kamenica, Serbia, May 28-30, 2012. p.42-47. [http://www.educons.edu.rs/sites/default/files/zastita\\_zivotne\\_sredine/Newenviro%20proceedings.pdf](http://www.educons.edu.rs/sites/default/files/zastita_zivotne_sredine/Newenviro%20proceedings.pdf)

4. Stijepić, M., Milanović, S., **Glušac, J.**, Kalaba, V., Kanurić, K., Vukić, V., Djurdjević-Milošević, D., Ranogajec, M. (2011) Sensory and microbiological properties of yoghurt enriched with honey and whey proteine concentrate. 2nd CEFSEER (Center of Excellence for Food Safety and Emerging Risks) Workshop "Persistent organic pollutants in food and environment", 26th Symposium on Recent Developments in Dairy Technology, and BIOXEN seminar "Novel approaches for environmental protection", Faculty of Technology, University of Novi Sad, Serbia, 8-10 September, Proceedings, 136-141.

#### **Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u cjelini**

1. Stijepić M., **Glušac, J.**, Ilić, D., Đurđević Milošević, D. (2009) Uticaj dodatka inulina i termičkog tretmana mlijeka na viskozitet čvrstog kozjeg jogurta. VIII Simpozijum sa međunarodnim učešćem „Savremene tehnologije i privredni razvoj”, 23-24.10.2009, Leskovac, Zbornik radova, p. 19-27. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?artid=0352-65420919104S>
2. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D., Ilić, D. (2009) Promjene sinereze jogurta obogaćenog koncentratom serum proteina u zavisnosti od termičkog tretmana mlijeka. Zbornik radova Tehnološkog fakulteta u Leskovcu.19:104-111.
3. Stijepić M., Đurđević Milošević, D., **Glušac, J.** (2008) Ispitivanje uticaja dodataka surutke u prahu na sinerezu tečnog probiotičkog napitka tokom dugotrajnijeg čuvanja. Drugi internacionalni kongres "Ekologija, zdravlje, rad, sport", Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina, 25-28. juna, Zbornik radova 2, pp. 222-226.
4. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2008) Promjene kiselosti tokom čuvanja probiotičkih napitaka proizvedenih od mješavine kravljeg mlijeka i surutke. Drugi internacionalni kongres "Ekologija, zdravlje, rad, sport", Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina, 25-28. juna, Zbornik radova 2, pp. 227-231.

#### **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu**

1. **Glušac J.**, Veljović-Jovanović, S., Kukavica, B. (2013) Antioxidant response in naturally senescence of *Sempervivum tectorum* L. leaves. 11th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, July 17-19, 2013, Warsaw, Poland. BioTechnologia 94 (2), p. 220. Poster presentation. <http://www.biotechnologia-journal.org/journals/biotechnologia-942>
2. Ćirić, B., **Glušac, J.**, Boroja, M., Škondrić, S., Kukavica, B. 2012. Characterization of antioxidative metabolism of obligate serpentinophyte *Halacsya sendtneri* (Boiss.) Dörf. International Conference Newenviro: *New approaches for assessment and improvement of environmental status in Balkan region: Interactions between organisms and environment*, Educons University, Sremska Kamenica, Serbia, May 28-30, 2012, Book of Abstracts, 52. Poster presentation

3. **Glušac J.**, Boroja, M., Veljovic-Jovanovic, S., Kukavica, B. (2011) Effects of drought, cadmium and manganese stress on leaf SOD, POD and CAT activities in CAM species *Sempervivum tectorum* L. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, July 5-8, 2011, Budapest, Hungary. Book of abstracts, p. 144. Poster presentation

**Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu**

1. **Glušac J.**, M. Boroja, B. Kukavica. (2010) Oksidativni stres u listu čuvarkeće (*Sempervivum tectorum* L.) kao posljedica procesa starenja i suše. II Simpozijum biologa Republike Srpske. Zbornik sažetaka, p. 69-70. Oral presentation
2. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2010) Optimizacija učešća inulina na ubrzanje fermentacije mlijeka i senzorska svojstva probiotičkog jogurta. Petnaesto međunarodno naučno-stručno savjetovanje agronoma Republike Srpske "Poljoprivreda i hrana - izazovi 21. vijeka", 16-19.03.2010., Trebinje, Zbornik sažetaka, p. 264.
3. Stijepić M., **Glušac, J.**, Đurđević Milošević, D. (2010) Promjene viskoziteta i sinereze probiotičkog jogurta obogaćenog inulinom tokom skladištenja. Petnaesto međunarodno naučno-stručno savjetovanje agronoma Republike Srpske "Poljoprivreda i hrana - izazovi 21. vijeka", 16-19.03.2010., Trebinje, Zbornik sažetaka, p. 265.

**Učešće u međunarodnim projektima:**

Učestvovala je u jednom projektu kao istraživač-saradnik:

1. TEMPUS projekat (*Network for education and training for public environmental laboratories 530554-TEMPUS-1-2012-1-SK-JPHES*), 2012-2015.

## 2. ZNAČAJ I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

### ➤ Značaj istraživanja

Ispitivanje umrežavanja kazeina, proteina surutke, pšeničnog glutena i glijadina, te BSA, do nedavno je praćeno prilagođenim metodama SDS-PAGE elektroforeze, SEM mikroskopije i HPLC. Tek razvojem savremenih instrumenata za kvantitativnu i kvalitativnu karakterizaciju disperznih sistema (LUMiSizer) i primjenom FT-IR spektroskopije u određivanju sekundarne strukture proteina, te reoloških metoda, dolazi do porasta interesovanja za proučavanje umrežavanja proteina.

U biološkom kontekstu, kada je u pitanju istraživanje umrežavanje (*cross-linking*), težište je na ispitivanju interakcija između polimernih lanaca, sa ciljem dobijanja podataka o strukturi i funkciji.

Posljednjih godina intenzivna su istraživanja, kao i primjena tirozinaza i peroksidaza u mnogobrojnim biotehnološkim procesima kao npr. u detoksikaciji fenolima zagađenih voda i zemljišta, u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, medicini i dr. Ispitivanje mehanizma umrežavanja proteina tirozinazama i peroksidazama, porijeklom iz i biljaka jeste problematika novijeg datuma. Proučavanje ove problematike ima kako fundamentalni tako i aplikativni značaj.

### ➤ Pregled istraživanja

Klasa III biljnih peroksidaza (POX, EC 1.11.1.7) su glikolizovane nespecifične peroksidaze uključene u sekretorne puteve u ćeliji. Brojna istraživanja su pokazala da peroksidaze imaju različite uloge u biljnim ćelijama: u lignifikaciji (Whetten i sar. 1998), suberizaciji (Espelie i sar. 1986), umrežavanju proteina u ćelijskom zidu (Fry 1986), katabolizmu auksina (Lagrimini i sar. 1997), odbrani od patogena (Chittoor i sar. 1999) i insekata (Bi i Felton 1995), oksidacija slobodnih fenola i flavona (Takahama, Egashirira i Wakamatsu 1989; Ros Barceló i sar., 2003), tolerantnost na stress indukovanoj soli (Amaya i sar. 1999) i starenju (Abeles i sar. 1988).

Peoksidaze koriste vodonik peroksid kao elektron akceptor za oksidaciju širokog spektra različitih supstrata. Postoji veliki broj jedinjenja koje peroksidaze koriste kao supstrate: gvajakol, tetrametilbenzidin, pirogalol, hidroksicinamične kiseline (kafeična, ferulična, hlorogena kiselina). Pored važne uloge u metabolizmu biljnih ćelija pokazano je da peroksidaze mogu da utiču na gluten na način da umrežavaju protein glutena i stvaraju kovalentne konjugate između glutena ili  $\beta$ -kazeina i arabinoksilana, odnosno da dodaju arabinoksilane glutenu preko ferulične kiseline i ostataka lizina, tirozina ili cisteina (Hilhorst *et al.*, 1999; Boeriu *et al.*, 2004). Takođe je pokazano da peroksidaze mogu da umrežavaju proteine kazeina (Matheis and Whitaker, 1984), apo- $\alpha$ -laktalbumina (Saricay i sar., 2013) i utiču na parcijalno umrežavanje surutkinih proteina (Thalman and Lötzbeyer, 2002; Færgemand *et al.*, 1998).

Tirozinaze ili polifenol oksidaze (EC 1.14.18.1) su enzimi, sa bakrom u centru, koji su široko rasprostranjeni u animalnim, biljnim i tkivima mikroorganizama (Lerch, 1983). Tirozinaze katalizuju kiseonik zavisnu oksidaciju monofenola ili o-difenola u o-hinone. O-hinoni su jako reaktivne supstance koje mogu da reaguju sa aminokiselinama, peptidima i proteinima i na taj način da utiču na strukturne i funkcionalne osobine ćelije. Tirozinaze mogu da oksiduju peptidne tirozinske rezidue u hinone, koji kasnije mogu da reaguju (neenzimatski) sa slobodnim sulfidrilnim i amino grupama i daju tirozin-cistein i tirozilizin mreže (Ito *et al.*, 1984). Mnogobrojne su fiziološke uloge tirozinaze (Mayer 2006): lignifikacija (López-Serrano *et al.*, 2004, Gabaldón *et al.*, 2005), odbrana od insekata i patogena (Mohammadi & Kazemi, 2002, Pinto *et al.*, 2008), uloga u tamnjenju tkiva (Coetzer *et al.*, 2001; Gandia-Herrero *et al.*, 2003). Najviše istraživanja je radeno na tirozinazama sisara, ali i bakterija *Streptomyces* (Ito and Oda, 2000; Katz and Betancourt, 1988; Lerch and Ettliger, 1972; Matoba *et al.*, 2006) i *Bacillus* (Glodfeder i sar., 2014; Isaschar-Ovdat i sar., 2014, Kanteev i sar., 2013) i gljiva: *Agaricus bisporus* (Wichers *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 2003), *N. crassa* (Lerch, 1983), *Trichoderma reesei* (Selinheimo *et al.*, 2006b), *Aspergillus* (Bull and Carter, 1973), *Ascovaginospora* (Abdel-Raheem and Shearer, 2002), *Trametes* (Tomsovsky and Homolka, 2004), *Pycnoporus* species (Halaouli *et al.*, 2005) and *Marinomonas* (Lopez-Serrano *et al.*, 2000). Tirozinaze iz različitih vrsta su bile testirane za sposobnost umrežavanja proteina mlijeka i surutke (Hejnis i sar., 2010; Selinheimo i sar., 2007; Thalman Lötzbeyer, 2002), a nedavno i glicinin iz soje (Isaschar-Ovdat i sar., 2014).

Umrežavanje (Cross-linking) je stvaranje jonske ili kovalentne veze između 2 polimerna lanca. U biološkom kontekstu, umrežavanje predstavlja molekularnu reakciju u kojoj se dvije molekularne jedinice spajaju, a njihova interakcija predstavlja težište istraživanja. U procesima izučavanja protein-protein interakcija, u cilju dobijanja što kvalitetnijih podataka o strukturi i funkciji proteina, tehnike umrežavanja su jako korisne. Umrežavanje, takođe, pomaže u cilju dobijanja vitalnih informacija o interakcijama sa receptorima, u signalnim kaskadama i multiproteinskim kompleksima. Informacije dobijene iz

eksperimenta sa umrežavanjima su jako značajne jer daju uvid o strukturalnim podacima, mapiranju protein-protein interakcija sa specifičnim domenom ili aminokiselinom. Najznačajnija prednost umrežavanja jeste u uključivanju nekovalentnih protein-protein interakcija, posebno onih koje su tranzicione ili zavisne od specifičnih fizioloških uslova, da budu dio kovalentno vezanog kompleksa koji obezbjeđuje dalje informacije kroz korake prečišćavanja i daljeg analiziranja.

Umrežavanje proteina se može postići korištenjem različitih enzima. Obično se ostvaruje preko aromatičnih grupa proteina ili ugljenih hidrata ili kroz određene amino kisline prisutne u proteinima. Rezultat je direktne enzimske katalize i formacije mreže, a može da se javi indirektno preko enzimske produkcije umrežavajućeg agensa, kao što su vodonik peroksid ili lipidni radikali koji mogu da oksiduju reaktivne strukture i na taj način stvaraju mrežne formacije. Proteini imaju nekoliko reaktivnih grupa za umrežavajuće enzime, kao što su ostaci glutamina, lizina, tirozina i cisteina. Umrežavanje kod samih biljaka može da se dešava između polisaharida, proteina i između proteina i polisaharida.

Savremena nauka svakodnevno nudi brojna nova rješenja za povećanje proizvodnje hrane, uz istovremene pokušaje eliminisanja alergena i povećanje nutritivnih i funkcionalnih osobina hrane. Podaci o biohemijskim karakteristikama enzima iz odabranih biljnih vrsta pružili bi neophodne informacije i pomogli bi u unaprijeđenju kreiranja novih životno važnih proizvoda u oblastima biohemije i biotehnologije.

#### ➤ Radna hipoteza sa ciljem istraživanja

Peroksidaze i tirozinaze ili polifenol oksidaze su sveprisutni enzimi u svim živim bićima. Brojna istraživanja su pokazala različite fiziološke uloge peroksidaza u biljkama, kao što su u lignifikaciji, suberizaciji, umrežavanju proteina u ćelijskom zidu i dr., dok je poznato da tirozinaze učestvuju u tamnjenju tkiva, lignifikaciji, odbrani od insekata i patogena i dr. Novija istraživanja pokazuju ulogu peroksidaza i tirozinaza u umrežavanju proteina. Umrežavanje (*cross-linking*) jeste stvaranje jonske ili kovalentne veze između 2 polimerna lanca i u biološkom kontekstu težište istraživanja je upravo interakcija između polimernih lanaca, sa ciljem dobijanja podataka o strukturi i funkciji.

Ciljevi doktorske teze su usmjeren ka istraživanjima iz oblasti biljne proteomike. Prvi cilj je prečišćavanje i biohemijska karakterizacija enzima peroksidaza i tirozinaza u korijenu i listu kukuruza (*Zea mays* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.). Drugi cilj istraživanja je usmjeren ka određivanju sposobnosti enzima peroksidaza (POX, EC 1.11.1.7) i tirozinaza (EC 1.14.18.1) iz kukuruza i pasulja za cross-linking (umrežavanje) odabranih modelinih proteina. Nova bazična saznanja iz proteomike biće potencijalno primjenjivi u oblastima biohemije i biotehnologije.

#### ➤ Materijal i metod rada

U izradi doktorske disertacije predviđeno je da se koriste kao materijal biljke pasulja i kukuruza uzgojene u hidroponičnim kulturama. Nakon ekstrakcije solubilnih proteina i proteina vezanih za ćelijski zid koristiće se spektrofotometrijske metode, hromatografske metode i metode elektroforeze za prečišćavanje i biohemijsku karakterizaciju peroksidaza i tirozinaza.

Spektrofotometrijske metode

- određivanje koncentracije proteina
- određivanje aktivnosti enzima

Hromatografske metode:

- gel filtracija
- jonoizmjenjivačka hromatografija
- afinitetna hromatografija

Elektroforetske metode

- nativna elektroforeza - razdvajanje peroksidaznih i tirozinaznih izoformi
- SDS elektroforeza – dobijanje proteinskih profila i praćenje koraka prečišćavanja
- IEF elektroforeza - karakterizacija pI vrijednosti peroksidaznih i tiroksidaznih izoformi

Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Texture analyser TA.XPplus (Micro Stable System, UK)

High Performance HAAKE RheoStress 600 (Karlsruhe, Germany)

Rezultati će se statistički obraditi u programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc. USA) i prikazati kao srednje vrijednosti ( $\pm$ SD), te sprovesti odgovarajući statistički testovi nakon ANOVE.

#### ➤ Naučni doprinos istraživanja

Optimizacija procesa izolacije i prečišćavanja enzima, te biohemijska karakterizacija i razumijevanje procesa umrežavanja proteina neki su od najznačajnijih aktuelnih problema u biohemiji koja se bavi ispitivanjem struktura i funkcija makromolekula. Iako je mnogo podataka u literaturi o različitim preoksidaznim izoformama još uvijek se ne može specifična funkcija *in vivo* povezati sa određenim peroksidaznim izoformama.

Razumijevanje mehanizama umrežavanja proteina, posredovanih tiroksinazama i peroksidazama može pomoći u pronalaženju optimalnih uslova i načina za njihovu širu primjenu u industriji i biotehnologiji.

Poznavanje stabilnosti enzima je naročito važno u slučaju enzima koji se koriste u industriji, medicini, kao što je slučaj sa proteinima koji su predmet istraživanja predviđenog u okviru ove doktorske teze. Podaci o biohemijskim karakteristikama enzima odabranih biljnih vrsta pružili bi nova naučna saznanja o ovim enzimima, kao i neophodne informacije koje bi pomogle u unaprijeđenju kreiranja novih proizvoda u oblastima biohemije i biotehnologije.

#### ➤ Prilog: citirana literatura

- Abeles, F.B., Dunn, L.J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R.E. and Schmidt, J. (1988) *Plant Physiol.* 87: 609–615.
- Amaya, I., Botella, M.A., de la Calle, M., Medina M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A. and Valpuesta, V. (1999) *FEBS Lett.* 457: 80–84.
- Chittoor, J.M., Leach, J.E. and White, F.F. (1999) In *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Edited by Datta, S.K. and Muthukrishnan, S. pp. 171–193. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Espelie, K.E. and Kolattukudy, P.E. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 240: 539–545.
- Fry, S.C. (1986) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 165–186.
- Lagrimini, L.M., Joly, R.J., Dunlap, J.R. and Liu, T.-T.Y. (1997) *Plant Mol. Biol.* 33: 887–895.
- Whetten, R.W., Mackay, J.J. and Sederoff, R.R. (1998) *Annu. Rev. Plant Physiol.*



- Plant Mol. Biol. 49: 585–609.
- Y. Saricay, P. A. Wierenga, R. de Vries. (2013) Nanostructure development during peroxidase catalyzed cross-linking of apo- $\alpha$ -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, 33, 280-288.
  - Ros Barceló, A., Pomar, F., López-Serrano, M., and M. A. Padreño (2003) Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology*, 30, 577-591
  - Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J., and N. Tumer (2001) Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 652-657.
  - Gandia-Herrero, F., Jiménez, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., and J. Escribano (2003) Tyrosinase inhibitory activity of cucumber compounds: enzymes responsible for browning in cucumber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 7764-7769.
  - Gabaldón, C., López Serano, M., Pedreño, M.A., and A. Ros Barceló (2005) Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 139, 1138-1154.
  - López Serano, M., Fernández, M.D., Pomar, F., Pedreño, M.A., and A. Ros Barceló (2004) *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *Journal of Experimental Botany*, 55, 423-431.
  - Mohammadi, M., and H. Kazemi (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162, 491-498.
  - A.M. Mayer (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review *Phytochemistry* 67, 2318–2331
  - Goldfeder, M., Kanteev, M. Isaschar-Ovdat, S., Adir, N. and Fishman, A. (2014) Determination of tyrosinase substrate binding modes reveals the mechanistic differences between type-3 copper proteins *Nat. Commun.* DOI 10.1038/ncomms5505.
  - Isaschar-Ovdat, S., Rosenberg, M., Lesmes, U. and Fishman, A. (2014) Characterization of oil-in-water emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked soy glycinin *Food Hydrocolloid*
  - Kanteev, M., Goldfeder, M., Chojnacki, M., Adir, N. and Fishman, A. (2013) The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium* *J. Biol. Inorg. Chem.* 18:895-903
  - Heijnis, W. H., Wierenga, P. A., van Berkel, W. J. H., & Gruppen, H. (2010) Directing the oligomer size distribution of peroxidase-mediated cross-linked bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5692e5697.
  - Selinheimo, E., Autio, K., Kruus, K. and Buchert, J. (2007) Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6357e6365.
  - Thalmann, C. and Lotzbeyer, T. (2002) Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology*, 214, 276e281.

### 3. OCJENA I PRIJEDLOG

Na osnovu svega prethodno izloženog Komisija smatra da kandidat mr Jovana Glušac ispunjava sve Zakonom predviđene uslove za izradu prijavljene doktorske teze.

S obzirom na veći broj objavljenih naučnih radova, uspješno odbranjen magistarski rad iz oblasti biohemije biljaka, mišljenja smo da kandidat posjeduje odgovarajuće naučne kvalifikacije da pristupi izradi navedene doktorske teze.

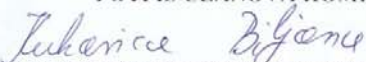
Predložena istraživanja su aktuelna i naučno opravdana, a rezultati koji se očekuju će imati kako svoj fundamentalni, tako i primjenljiv značaj – doprinijeće boljem poznavanju biohemijskih karakteristika peroksidaza i tirozinaza, kao i mehanizma umrežavanja proteina katalizovanog peroksidazama i tirozinazama. Realizacija definisanih ciljeva navedenih u Prijavi teme za izradu ove doktorske teze, na osnovu predstavljenih hipoteza, primjene naučno zasnovanih metoda, nesumnjivo će dovesti do novih saznanja i pružiti višestruki naučni doprinos.


Komisija je saglasna u ocjeni da je tema "Biohemijska karakterizacija peroksidaza i tirozinaza iz kukuruza i pasulja i mehanizmi umrežavanja proteina katalizovani peroksidazama i tirozinazama" podobna za izradu doktorske teze, kao i da kandidat mr Jovana Glušac ispunjava sve uslove za izradu iste.


Komisija jednoglasno sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta i Senatu Univerziteta u Banjoj Luci da usvoji Izvještaj i odobri izradu navedene doktorske teze.

U Banjoj Luci, Novom Sadu, april 2015.  
godine

POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

  
1. Dr Biljana Kukavica, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, predsjednik

  
2. Dr Danijela Kojić, dozent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, član

  
3. Dr Sinjša Skondrić, dozent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, 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 razloge zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.