

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Наставно – научном већу

Предмет: Извештај Комисије за преглед и оцену докторске дисертације Марије Д. Станишић, мастер биохемичара.

На редовној седници Наставно – научног већа Хемијског факултета, одржаној 15. маја 2026. године, одлука бр. 197/7 , изабрани смо за чланове Комисије за преглед и оцену докторске дисертације кандидата Марије Д. Станишић, мастер биохемичара, под насловом:

„Имобилизација хемијски модификованих и мутантних варијанти ензима пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) и глукоза-оксидазе из гљиве *Aspergillus niger* синтезом биокомполитних материјала“.

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду дало је сагласност о прихватању теме докторске дисертације на седници одржаној 27. 4. 2023. године (одлука бр. 61206-1497/2-23).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација Марије Д. Станишић написана је на српском језику, на 119 страна А4 формата (фонт *Times New Roman* величине 12 pt за основни текст, описе слика и табела и величине 10 pt за табеларне податке, проред 1, маргине 2 cm), садржи 77 слика, 41 табелу и 143 литературна навода. Дисертација је подељена на 7 поглавља: Увод (1 страна), Општи део (23 стране), Циљ (1 страна), Експериментални део (14 страна), Резултати и дискусија (67 страна), Закључак (2 стране) и Литература (11 стране). Поред наведеног, дисертација садржи и насловне стране на српском и енглеском језику, информације о ментору и члановима комисије, Захвалницу на српском језику (2 страна), Сажетак на српском и енглеском језику (по 1 страна), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (4 стране), Биографију кандидата на српском језику (1 страна), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истовестности (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране). Дисертација је по својој структури и садржају у потпуности у складу са стандардима прописаним од стране Универзитета у Београду.

Увод садржи опис предмета истраживања и даје општи оквир докторске дисертације. У овом поглављу указано је на значај ензима као високо селективних и ефикасних биокатализатора, али и на ограничења њихове шире примене која проистичу из недовољне стабилности у неповољним реакционим условима, као и отежаног издвајања и поновне употребе растворних ензима. Посебно је истакнут значај имобилизације ензима, хемијске модификације и протеинског инжењеринга као приступа за унапређење каталитичких и оперативних особина ензимских система. Увод такође дефинише научни и практични значај развоја нових биокомпозитних материјала заснованих на пероксидази из рена и глукоза-оксидази.

Општи део дисертације је подељен на пет целина. Прва целина даје преглед релевантне литературе која се односи на структурне и кинетичке особине глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger*, друга целина даје преглед кинетичких и структурних особина пероксидазе из рена. Обе целине такође дају приказе и њихове примене у биокатализи, биосензорима и имобилизованим ензимским системима. У трећој целини је дат преглед хемијских метода имобилизације гликопротеина са посебним освртом на перјодатну оксидацију. У четвртој целини је дат преглед метода протеинског инжењеринга са посебним освртом на методу информационог спектра (ISM) и њену примену у рационалном дизајну протеина, оријентисану имобилизацију и еукариотске експресионе системе у *Pichia pastoris*. У последњој петој целини је дат преглед примене метал-органичних оквира (MOF) и ZIF-8 материјала у синтези биокомпозитних имобилизованих ензимских система.

У поглављу **Циљ** наведен је основни циљ докторске дисертације, који се односи на развој и оптимизацију нових биокомпозитних материјала заснованих на комерцијалним, хемијски модификованим и мутантним варијантама ензима пероксидазе из рена и глукоза-оксидазе из гљиве *Aspergillus niger*. Посебно су истакнути задаци усмерени на повећање ензимске активности, стабилности, ефикасности имобилизације и могућности вишеструке употребе добијених биокаталитичких система. Као важан циљ наведено је и успостављање везе између структуре ензима, хемијске модификације, мутагенезе, услова биоминерализације и функционалних особина добијених *enzim@ZIF* и *enzim@ZIF@хидрогел* биокомпозита.

Експериментални део садржи систематичан приказ коришћених реагенаса, опреме и експерименталних метода примењених у оквиру спроведених истраживања.

У оквиру поглавља **Резултати и дискусија** су детаљно приказани и прокоментарисани резултати који проистичу из ове докторске дисертације. Ово поглавље је организовано у седам делова. У **првом делу** приказана су истраживања анализе утицаја перјодатне оксидације угљенохидратне компоненте глукоза-оксидазе на процес биоминерализације, као и на активност и стабилност добијених биокомпозита. У ту сврху извршена је перјодатна оксидација глукоза-оксидазе, након чега је ензим биоминерализован применом два различита начина биоминерализације, а потом су добијени биокомпозити структурно и кинетички окарактерисани. У **другом делу су приказана** испитивања утицаја перјодатне оксидације пероксидазе из рена на процес биоминерализације, како би се утврдило да ли се пероксидаза из рена понаша слично као и глукоза-оксидаза, односно да

ли овом хемијском модификацијом постиже добијање кинетички и структурно бољих биокомпозита у поређењу са биоминерализованом немодификованом пероксидазом из рена. У ову свху је комерцијални препарат пероксидазе из рена додатно пречишћен, перјодатно оксидован и биоминерализован, након чега су добијени биокомпозити структурно и кинетички окарактерисани. У **трећем делу** су приказана испитивања утицаја наелектрисања и типа хемијске модификације површине гликопротеина на процес биоминерализације, као и на активност и стабилност добијених биокомпозита. С тим циљем је глукоза-оксидаза хемијски модификована Л-аспартатом и Л-хистидином преко угљенохидратне компоненте, након чега су модификовани растворни ензими окарактерисани, а затим је анализиран утицај врсте модификације на процес биоминерализације и особине синтетисаних биокомпозита. У **четвртном делу** су приказана истраживања утицаја врсте лиганда на активност и стабилност биокомпозита *enzim@ZIF-zn1* и *enzim@ZIF-8*. У **петом делу** су приказана истраживања посвећена експресији и карактеризацији мутаната глукоза-оксидазе у *Pichia pastoris* KM71H. У овом делу приказана је примена ISM методе у предвиђању мутација, експресија и пречишћавање одабраних GOx мутаната, упоредна анализа њихових кинетичких параметара, корелација експерименталних резултата са карактеристичним ISM фреквенцијама, као и имобилизација мутаната у ZIF-8 процесом биомиметичке минерализације. У шестом делу је приказано истраживање које обухвата експресију и карактеризацију *wild type* и мутантних варијанти пероксидазе из рена, укључујући кинетичку карактеризацију, одређивање рН оптимума и имобилизацију добијених варијанти HRP у ZIF-8. У последњем, **седмом делу**, су приказана истраживања синтезе хибридних (HRP@ZIF-8)@хидрогел биокомпозита, што је подразумевало енкапсулацију HRP@ZIF-8 биокомпозита у алгинатним хидрогеловима. Испитана је и могућност вишеструке употребе, тако што је праћено обезбојавање синтетичких боја током више циклуса, а стабилност је праћена инкубирањем хибридних (HRP@ZIF-8)@хидрогел биокомпозита у органском растварачу.

У **Закључку** је дат сажет преглед резултата ове докторске студије и одговора на питања формулисана у оквиру циљева ове дисертације.

Део **Литература** садржи релевантне цитате радова из области истраживања и обухвата све литературне наводе који нису део оригиналних резултата приказаних у овој дисертацији.

Б. КРАТАК ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У овој докторској дисертацији развијени су нови биокомпозитни материјали засновани на ензимима пероксидази из рена (*Armoracia rusticana*, HRP) и глукоза-оксидази из гљиве *Aspergillus niger* (GOx), са циљем унапређења њихове активности, стабилности, ефикасности имобилизације и могућности вишеструке употребе. Испитивани су комерцијални, хемијски модификовани и мутантни облици ових ензима, као и њихова имобилизација у ZIF-8 и ZIF-zn1 структурама применом биомиметичке минерализације.

Додатно су развијени хибридни HRP@ZIF-8@алгинат биокомпозити ради побољшања механичке стабилности, лакшег издвајања из реакционе смеше и поновне употребе.

У првом делу истраживања показано је да перјодатна оксидација угљенохидратне компоненте глукоза-оксидазе утиче на процес формирања GOx@ZIF-8 биокомпозита, као и на њихову активност и стабилност. Оксидована GOx је, у поређењу са нативним ензимом, показала измењене интеракције са прекурсорима ZIF-8 структуре, што је омогућило добијање биокомпозита побољшаних биокаталитичких особина. Сличан приступ примењен је и код пероксидазе из рена, где је након пречишћавања HRP-C изоформе испитиван утицај перјодатне оксидације на биомиметичку минерализацију у ZIF-8. Резултати су показали да изоензимски састав и хемијска модификација HRP значајно утичу на активност, кинетичке параметре и термостабилност добијених HRP@ZIF-8 биокомпозита.

У наставку дисертације испитан је утицај функционализације глукоза-оксидазе L-хистидином и L-аспартатом на формирање и особине GOx@ZIF-8 биокомпозита. Показано је да увођење нових функционалних група и промена површинског наелектрисања ензима значајно утичу на интеракције са Zn^{2+} јонима, ефикасност биоминерализације, специфичну активност, рН профил и термостабилност добијених материјала. Посебно је значајно да је модификација L-хистидином допринела повољнијим интеракцијама са металним јонима и добијању биокомпозита са побољшаним функционалним својствима.

Испитан је и утицај концентрације и врсте имидазолатног лиганда на имобилизацију GOx у ZIF материјалима. Поред ZIF-8, синтетисани су и GOx@ZIF-zn биокомпозити, при чему је показано да избор лиганда, концентрација Zn^{2+} јона и односа концентрација лиганда и јона цинка значајно утичу на структуру, морфологију, активност и стабилност добијених биокомпозита. Ови резултати указују да се контролом услова синтезе могу добити *enzim@ZIF* материјали различитих структурних и биокаталитичких особина.

Посебан део дисертације био је усмерен на примену протеинског инжењеринга и методе информационог спектра (ISM) за рационални избор мутација глукоза-оксидазе и пероксидазе из рена. Произведене су и окарактерисане мутантне варијанте GOx, укључујући K152D, K152C, D180E, D180L, F484N и F484H. Показано је да поједине мутације доводе до значајних промена активности, кинетичких параметара и стабилности ензима. Посебно је важан резултат да је установљена повезаност између амплитуда карактеристичних ISM фреквенција и експериментално одређених кинетичких параметара, што потврђује применљивост ISM методе као алата за рационални избор мутација. Добијени GOx мутанти су затим имобилизовани у ZIF-8, чиме је показано да протеински инжењеринг може бити користан и за дизајн ензима погоднијих за имобилизацију.

У оквиру дисертације произведене су и *wild type* и мутантне варијанте HRP у експресионом систему *Pichia pastoris* KM71H. Добијени ензими су пречишћени, кинетички окарактерисани и имобилизовани у ZIF-8. Резултати су показали да мутације могу утицати на побољшање каталитичких особина, рН профил и понашање ензима током биомиметичке минерализације.

У завршном делу истраживања синтетисани су хибридни HRP@ZIF-8@алгинат биокомпозити. Енкапсулацијом HRP@ZIF-8 у алгинатне микрокуглице добијени су системи који се лакше издвајају из реакционе смеше и погоднији су за поновну употребу. Испитана је њихова активност, рН профил, стабилност у органском растварачу и примена у обезбојавању синтетичких боја *Evans Blue* и *Methyl Orange*. Показано је да хибридни биокомпозити задржавају каталитичку активност током више реакционих циклуса, што указује на њихов потенцијал за примену у третману отпадних вода.

Сумирано, резултати ове докторске дисертације показали су да комбинација хемијске модификације, протеинског инжењеринга, биоинформатичког дизајна и биомиметичке минерализације представља ефикасан приступ за развој нових ензимских биокомпозита. Добијени GOx@ZIF, HRP@ZIF и HRP@ZIF@алгинат системи показали су побољшану активност, стабилност и могућност вишеструке употребе, што их чини перспективним биокатализаторима за примену у биокатализи, биосензорима и заштити животне средине.

В. КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА КАНДИДАТА СА РЕЗУЛТАТИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Ензими представљају високо ефикасне и селективне биокатализаторе са широком применом у биотехнологији, индустрији, аналитичкој хемији, медицини и заштити животне средине. Међутим, њихова практична примена често је ограничена смањеном стабилношћу у условима повишене температуре, присуства органских растварача, неповољних рН вредности и других фактора који доводе до губитка активности. Због тога се хемијска модификација и имобилизација ензима на чврстим носачима широко користе као стратегије за побољшање каталитичких перформанси, стабилности и могућности поновне употребе ензима [1]. Резултати докторске дисертације Марије Д. Станишић у потпуности се уклапају у ове савремене правце истраживања, јер показују да се комбинацијом хемијске модификације, протеинског инжењеринга и биомиметичке минерализације могу добити ензимски биокомпозити побољшаних биокаталитичких особина.

Глукоза-оксидаза из *Aspergillus niger* и пероксидаза из рена представљају два добро проучена и индустријски значајна ензима. GOx је флавопротеин чија структура, каталитичка функција, производња и примене у биотехнологији и аналитичким системима представљају предмет бројних истраживања [2]. Са друге стране, HRP је класичан и широко примењиван ензим, значајан у ензимским есејима, биокатализи, биосензорима и реакцијама оксидације различитих супстрата [3]. Управо због значајне примене ова два ензима, развој стабилнијих, активнијих и виšekратно употребљивих облика GOx и HRP представља важан правац у савременој биокатализи.

Метал-органски оквири, а посебно ZIF материјали, последњих година представљају значајну платформу за имобилизацију ензима. У литератури је показано да MOF материјали нису само пасивни носачи, већ могу да обезбеде заштиту ензима, побољшају њихову стабилност и омогуће лакше руковање биокатализаторима. Посебан значај има биомиметичка минерализација, код које се ензим уграђује током самог формирања MOF

структуре, при благим условима, што омогућава добијање enzim@MOF биокомпозита са заштитном неорганско-органском матрицом [4]. Резултати ове дисертације надовезују се на ова сазнања, али их проширују тиме што показују да особине самог ензима, као што су површинско наелектрисање, гликозилација и присуство специфичних функционалних група, значајно утичу на процес биоминерализације и особине добијених биокомпозита.

Један од важних резултата дисертације односи се на примену перјодатне оксидације угљенохидратне компоненте гликопротеина као стратегије за унапређење биомиметичке минерализације. У литератури је показано да перјодатна оксидација може утицати на структуру и особине глукоза-оксидазе, али без нужно потпуног нарушавања активности ензима [5]. У овој дисертацији показано је да перјодатна оксидација GOx мења површинска својства ензима и његове интеракције са Zn^{2+} јонима и 2-метилимидазолом, што доводи до ефикаснијег формирања GOx@ZIF-8 биокомпозита. Добијени биокомпозити показали су побољшану специфичну активност и бољу стабилност у односу на одговарајуће системе добијене од нативног ензима. На тај начин је показано да перјодатна оксидација није само поступак за увођење реактивних алдехидних група, већ и ефикасан начин за подешавање интеракција између гликопротеина и прекурсора ZIF структуре.

Сличан приступ примењен је и код пероксидазе из рена. У дисертацији је показано да пречишћавање HRP-C изоформе, као и перјодатна оксидација угљенохидратне компоненте HRP, значајно утичу на формирање и особине HRP@ZIF-8 биокомпозита. Ови резултати су у складу са општим сазнањима да се особине ензима могу побољшати комбинацијом хемијске модификације и имобилизације [6], али истовремено указују да код гликопротеинских ензима треба узети у обзир и изоформски састав, степен модификације и површинску хемију самог ензима.

Посебно важан део дисертације односи се на функционализацију глукоза-оксидазе L-хистидином и L-аспаратом. У литератури је показано да површинска функционализација протеина може представљати општу стратегију за олакшавање биомиметичке минерализације ензима у ZIF-8 [7]. Резултати ове дисертације су у складу са тим налазима, јер је показано да увођење L-хистидина у угљенохидратну компоненту GOx доводи до формирања координативних веза са Zn^{2+} јонима и ефикаснијег формирања GOx@ZIF-8 биокомпозита. Са друге стране, модификација L-аспаратом омогућила је испитивање утицаја негативно наелектрисаних карбоксилних група на процес биоминерализације, што је допринело бољем разумевању улоге површинског наелектрисања у формирању enzim@ZIF биокомпозита.

У дисертацији је, поред ZIF-8, испитана и имобилизација GOx у ZIF-znI структури. Овај део истраживања је посебно значајан јер је ZIF-znI знатно мање испитиван као носач за ензиме у поређењу са ZIF-8. Литературни подаци показују да избор MOF структуре, тј. лиганда може значајно утицати на активност имобилизованог ензима, као што је показано на примеру лаказе, која је у одређеним условима била погоднија за имобилизацију у ZIF-znI него у Fe-BTC носачу [8]. Резултати Марије Д. Станишић показали су да се GOx може успешно биоминерализовати у ZIF-znI структури и да промена концентрације Zn^{2+} јона и односа имидазола и 2-метилимидазола значајно утиче на структуру, морфологију,

активност и стабилност добијених биокомполита. Ови резултати проширују примену ZIF-znI материјала на развој GOx биокатализатора побољшаних перформанси.

Значајан аспект дисертације представља примена протеинског инжењеринга и методе информационог спектра (ISM) за рационални избор мутација. ISM метода омогућава анализу аминокиселинске секвенце као нумеричког сигнала, при чему карактеристичне фреквенције могу бити повезане са функционалним особинама протеина [9]. У овој дисертацији ISM метода је примењена за избор мутација GOx, након чега су произведени и окарактерисани мутанти K152D, K152C, D180E, D180L, F484N и F484H. Показано је да поједине мутације доводе до значајних побољшања активности, кинетичких параметара и стабилности ензима. Посебно је важно што је установљена повезаност између амплитуда карактеристичних ISM фреквенција и експериментално одређених кинетичких параметара, што потврђује применљивост ISM методе као алата за рационални избор мутација и предвиђање функционалних промена код ензима.

У оквиру дисертације произведене су и *wild type* и мутантне варијанте HRP у експресионом систему *Pichia pastoris*. Иако су приноси рекомбинантних HRP варијанти били релативно ниски, резултати су показали да мутације могу утицати на каталитичке особине, рН профил и понашање ензима током биомиметичке минерализације. Ови резултати су значајни јер указују да протеински инжењеринг може бити користан не само за побољшање особина растворних ензима, већ и за дизајн ензима погоднијих за имобилизацију у ZIF материјалима.

Завршни део дисертације односи се на развој хибридних HRP@ZIF-8@алгинат биокомполита. Овај приступ је у складу са савременим трендом да се прашкасти MOF материјали уграђују у хидрогелове или друге макроскопске носаче како би се превазишли проблеми отежаног издвајања из реакционе смеше, губитка материјала и ограничене поновне употребе. У литератури су описани ZIF-8@алгинат хидрогелни композити као системи који омогућавају лакше руковање, бољу стабилност и примену у уклањању загађујућих јона из воде [10]. У овој дисертацији је показано да енкапсулација HRP@ZIF-8 у алгинатне микрокуглице омогућава добијање хибридних биокомполита који задржавају ензимску активност, лакше се издвајају из реакционе смеше и могу се користити у више реакционих циклуса. Њихова примена у обезбојавању синтетичких боја *Evans Blue* и *Methyl Orange* указује на потенцијал ових система за примену у третману отпадних вода и другим процесима од значаја за заштиту животне средине.

У целини посматрано, резултати докторске дисертације Марије Д. Станишић добро су позиционирани у односу на савремене литературне податке из области имобилизације ензима, биомиметичке минерализације, ZIF биокомполита, хемијске модификације гликопротеина и протеинског инжењеринга. У односу на претходна истраживања, дисертација доноси више важних доприноса: показује да перјодатна оксидација угљенохидратне компоненте GOx и HRP може бити коришћена као стратегија за унапређење биомиметичке минерализације; доказује да функционализација GOx L-хистидином и L-аспартатом омогућава контролу интеракција ензима са Zn²⁺ јонима и прекурсорима ZIF-8; проширује примену ZIF-znI структуре на имобилизацију GOx; повезује ISM анализу са експериментално добијеним кинетичким параметрима GOx

мутаната; и развија хибридне HRP@ZIF-8@алгинат биокомпозите погодне за поновну употребу и примену у обезбојавању синтетичких боја. На тај начин резултати ове дисертације не само да су у складу са досадашњим сазнањима из литературе, већ их проширују и доприносе развоју нових стабилних и функционалних ензимских биокомпозита за примену у биокатализи, биосензорима и заштити животне средине.

Литература

1. Cowan, D.A.; Fernandez-Lafuente, R. Enhancing the Functional Properties of Thermophilic Enzymes by Chemical Modification and Immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* 2011, 49, 326–346. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.023>
2. Bauer, J.A.; Zámocká, M.; Majtán, J.; Bauerová-Hlinková, V. Glucose Oxidase, an Enzyme “Ferrari”: Its Structure, Function, Production and Properties in the Light of Various Industrial and Biotechnological Applications. *Biomolecules* 2022, 12. <https://doi.org/10.3390/biom12030472>
3. Veitch, N.C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. *Phytochemistry* 2004, 65, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
4. Liang, K.; Ricco, R.; Doherty, C.M.; Styles, M.J.; Bell, S.; Kirby, N.; Mudie, S.; Haylock, D.; Hill, A.J.; Doonan, C.J.; et al. Biomimetic Mineralization of Metal-Organic Frameworks as Protective Coatings for Biomacromolecules. *Nat. Commun.* 2015, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8240>
5. Nakamura, S.; Hayashi, S.; Koga, K. Effect of Periodate Oxidation on the Structure and Properties of Glucose Oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 1976, 445, 294–308, [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(76\)90084-X](https://doi.org/10.1016/0005-2744(76)90084-X)
6. Cowan, D.A.; Fernandez-Lafuente, R. Enhancing the Functional Properties of Thermophilic Enzymes by Chemical Modification and Immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* 2011, 49, 326–346. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.023>
7. Maddigan, N.K.; Tarzia, A.; Huang, D.M.; Sumby, C.J.; Bell, S.G.; Falcaro, P.; Doonan, C.J. Protein Surface Functionalisation as a General Strategy for Facilitating Biomimetic Mineralisation of ZIF-8. *Chem. Sci.* 2018, 9, 4217–4223. <https://doi.org/10.1039/C8SC00825F>
8. Tocco, D.; Carucci, C.; Todde, D.; Shortall, K.; Otero, F.; Sanjust, E.; Magner, E.; Salis, A. Enzyme Immobilization on Metal Organic Frameworks: Laccase from *Aspergillus* Sp. Is Better Adapted to ZIF-Zni Rather than Fe-BTC. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2021, 208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112147>
9. Veljkovic, V.; Cosic, I.; Dimitrijevic; Lalovic, D. Is It Possible to Analyze DNA and Protein Sequences by the Methods of Digital Signal Processing? *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1985, BME-32, 337–341. <https://doi.org/10.1109/tbme.1985.325549>
10. Feng, Y.; Sawut, A.; Simayi, R.; Maimaitiyiming, X.; Jiao, X. In Situ Self-Assembly of ZIF-8@sodium Alginate Composite Hydrogels for Enhanced Adsorption of Cu²⁺ Ions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2024, 702. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.135040>

Г. НАУЧНИ РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У МЕЂУНАРОДНИМ ЧАСОПИСИМА И САОПШТЕЊА СА СКУПОВА КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су четири рада објављена у водећим међународним часописима:

Водећи међународни часописи M21a:

1. **Stanišić, M.D.**, Kokar, N.P., Ristić, P., Balaž, A.M., Senćanski, M., Ognjanović, M., Đokić, V.R., Prodanović, R., Todorović, T.R. Chemical modification of glycoproteins' carbohydrate moiety as a general strategy for the synthesis of efficient biocatalysts by biomimetic mineralization: The case of glucose oxidase, *Polymers*, 2021, 13 (20), 3875. <https://doi.org/10.3390/polym13223875>
2. **Stanišić, D.M.**, Kokar, N.P., Ristić, P., Balaž, A.M., Ognjanović, M., Đokić, V.R., Prodanović, R., Todorović, T.R. The Influence of Isoenzyme Composition and Chemical Modification on Horseradish Peroxidase@ZIF-8 Biocomposite Performance, *Polymers*, 2022, 14(22), 4834. <https://doi.org/10.3390/polym14224834>

Међународни часописи M22:

1. **Stanišić M.**, Crnoglavac Popović M., Radenković M., Bajac B., Tadić V., Prodanović O., Prodanović R., Biomimetic mineralization of chemically modified glucose oxidase from *Aspergillus niger* in ZIF-8, *Biotechnology Letters*, 2026, 48 (2), 46. <https://doi.org/10.1007/s10529-026-03722-8>
2. **Stanišić M.**, Crnoglavac Popović M., Knežević N., Radenković M., Bajac B., Prodanović O., Prodanović R., Biomineralization of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* in ZIF-zni for Enhanced Biocatalytic Performance, *Bioengineering*, 2026, 13 (4), 465. <https://doi.org/10.3390/bioengineering13040465>

Научна саопштења са међународних научних скупова штампана у изводу M34:

1. **M. Stanišić**, P. Ristić, A. M. Balaž, M. Senćanski, D. Mitić, R. Prodanović, T. Todorović, Efficient enzyme@MOF composites for biocatalysis, EUROBIOTECH 8th Central European Congress of Life Sciences, 20-22 June 2022, Krakow, Poland, Book of Abstracts, pp. 138.
2. **M. Stanišić**, P. Ristić, V. Đokić, A. M., Balaž, R. Prodanović, T. Todorović, Periodate oxidized horseradish peroxidase@ZIF-8 nanocomposite, NANOTECHNOLOGY NN22 19th International Conference on Nanoscience & Nanotechnologies, 5-8 July 2022., Thessaloniki, Greece, Book of Abstracts, pp. 138.
3. P. Ristić, **M. Stanišić**, V. Đokić, A. M. Balaž, R. Prodanović, T. Todorović, Periodate oxidized horseradish glucose oxidase@ZIF-8 nanocomposite, NANOTECHNOLOGY

NN22 19th International Conference on Nanoscience & Nanotechnologies, 5-8 July 2022., Thessaloniki, Greece, Book of Abstracts, pp. 138.

4. M. Senćanski, R. Prodanović, P. Ristić, A. M. Balaž, **M. Stanišić**, T. Todorović, Modeling of catalytic activity and enzyme MOF interactions using a combined in silico approach, XXII Annual conference YUCOMAT, 30. August – 3. September 2021, Herceg Novi, Montenegro, Book of Abstracts P.S.III.16, pp. 24.
5. **M. Stanišić**, M. C. Popović, N. P. Kokar, N. Kaličanin, M. Radenković, B. Bajac, O. Prodanović, R. Prodanović, Immobilization of glucose oxidase by biomineralization using different imidazole derivatives, FEBS33+ Meeting, Belgrade, September 24-27 2025, Book of Abstracts, p. 144

Научна саопштења са националних научних скупова штампана у изводу М64:

1. **M. Stanišić**, N. Popović, P. Ristić, A. M. Balaž, M. Senćanski, R. Prodanović, T. Todorović, Biomimetic mineralization of periodate oxidized glucose oxidase, X Conference of the Serbian Biochemical Society, 24. September 2021, Kragujevac, Book of Abstracts, pp. 148.
2. A. M. Balaž, M. Crnoglavac Popović, **M. Stanišić**, P. Ristić, M. Senćanski, T. Todorović, R. Prodanović, Horseradish peroxidase C1A wild type gene and its variants expressed in *Pichia pastoris* KM71H strain, X Conference of the Serbian Biochemical Society, 24. September 2021, Kragujevac, Book of Abstracts pp. 49.
3. **M. Stanišić**, A. Grujić, M. C. Popović, M. Radenković, B. Bajac, O. Prodanović, R. Prodanović, Immobilization of chemically modified glucose-oxidase by biomineralization in ZIF-8, Serbian Biochemical Society Thirteenth Conference 2024 „Amplifying Biochemistry Concepts“, Kragujevac, September 19-20 2024, Book of Abstracts, p. 92.

Д. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.) и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације под насловом „Имобилизација хемијски модификованих и мутантних варијанти ензима пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) и глукоза-оксидаза из гљиве *Aspergillus niger* синтезом бикомпозитних материјала“, аутора Марије Д. Станишић, констатујемо да утврђено подударане текста износи 15%. Овај степен подударности последица је универзалних скраћеница, назива једињења, цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података

у вези са темом ове дисертације као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације што је у складу са чланом 9. овог Правилника.

Због свега наведеног, сматрамо да је докторска дисертација Марије Д. Станишић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Е. ЗАКЉУЧАК

На основу увида у целокупну садржину докторске дисертације под називом „Имобилизација хемијски модификованих и мутантних варијанти ензима пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) и глукоза-оксидаза из гљиве *Aspergillus niger* синтезом биокмпозитних материјала“ Комисија сматра да је кандидаткиња, мастер биохемичар Марија Д. Станишић, у потпуности и успешно одговорила на све постављене истраживачке задатке.

Кандидаткиња је показала способност самосталног научноистраживачког рада кроз планирање и извођење сложених експеримената који обухватају молекуларно-биолошке, биохемијске, кинетичке, електрофоретске, структурне и физичко-хемијске методе. Успешно је применила и повезала различите експерименталне и биоинформатичке приступе, укључујући хемијску модификацију гликопротеина, протеински инжењеринг, биомиметичку минерализацију у ZIF структурама, кинетичку и структурну карактеризацију ензима и биокмпозита, као и развој хибридниh *enzim@ZIF@хидрогел* биокмпозита.

У оквиру дисертације је урађена хемијска модификација гликопротеинских ензима, њихова биомиметичка минерализација у ZIF структурама, производња и карактеризација мутантних ензимских варијанти, као и развој хибридниh *enzim@ZIF@хидрогел* биокмпозита. Такође је интегрисан експериментални приступ са биоинформатичком анализом протеинске секвенце методом информационог спектра, што је омогућило повезивање промена у секвенци ензима са њиховим функционалним и кинетичким особинама. Резултати дисертације доприносе бољем разумевању утицаја хемијске модификације, површинског наелектрисања, врсте ZIF структуре и протеинског инжењеринга на процес биомиметичке минерализације и особине добијених биокмпозита. Развијени системи су показали побољшану активност, стабилност и потенцијал за вишеструку употребу, што их чини перспективним биокатализаторима за примену у биокатализи, биосензорима и процесима заштите животне средине. Комисија сматра да докторска дисертација представља оригиналан и научно значајан допринос области биохемије, ензимологије и биокмпозитних материјала.

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада у међународним часописима категорије M21a и два научна рада категорије M22. Осим тога, резултати су саопштени на више научних скупова међународног и националног значаја.

На основу свега приказаног, а у складу са Законом о високом образовању, Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да, поднету докторску дисертацију Марије Д. Станишић под насловом „Имобилизација хемијски модификованих и мутантних варијанти ензима пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) и глукоза-оксидазе из гљиве *Aspergillus niger* синтезом биокомпозитних материјала“ и одобри њену јавну одбрану, чиме би били испуњени услови за стицање научног звања доктор биохемијских наука.

У Београду, 5. 6. 2026.

Комисија:

др Радивоје Продановић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Марија Гавровић – Јанкуловић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Далибор Станковић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

др Оливера Продановић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за мултидисциплинарна истраживања, Институт
од националног значаја за Републику Србију

др Милан Сенћански, научни саветник
Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Универзитет у Београду, Институт од
националног значаја за Републику Србију