

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидата Лазара Поповића, мастер биохемичара, пријављене под насловом:

„Развој стратегије за контролу квалитета екстраката плодносног тела *Ganoderma resinaceum* Boud. засноване на метаболомичком профилисању и оптимизацији екстракције применом дизајна експеримента“

- 1. Научна област:** Хемија
Ужа научна област: Органска хемија
- 2. Предмет научног истраживања**

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је комбиновање приступа дизајна експеримента и мултиваријантне анализе у циљу добијања радног тока за проучавање утицаја параметара екстракције на метаболички профил добијених екстраката плодносних тела *Ganoderma resinaceum* Boud. У том циљу биће систематски испитани различити услови екстракције, са посебним освртом на утицај избора растварача. Релативни допринос појединачних параметара процеса екстракције биће квантификован и окарактерисан. Додатно, примена спектроскопских и хроматографских метода биће коришћена за детаљну процену утицаја услова екстракције на квалитативни и квантитативни састав екстракта. Метаболомичким приступом истражиће се потенцијални биомаркери квалитативног састава екстракта, као мере његовог квалитета. Изоловањем и карактерисањем метаболита ове гљиве добиће се библиотека једињења која могу служити као будући стандарди у карактеризацији и контроли квалитета екстракта. Коришћење гљиве *G. resinaceum* допринеће дубљем разумевању овог модел система као потенцијалног извора нових биоактивних једињења.

3. Основе хипотезе

Гљиве рода *Ganoderma* су познате већ више од две хиљаде година, па најранији писани подаци о њиховој употреби у традиционалној медицини датирају још из првог века пре нове ере. Такође, вишдесетничка савремена истраживања су била фокусирана на изучавање специјализованих метаболита овог рода (Paterson, 2006). Процењује се да је у 2020. години глобални принос јестивих и медицинских гљива износио 10,24 милиона тона. Према подацима за 2015. годину, произведено је приближно 160.000 тона гљива рода *Ganoderma*, уз укупан промет од око пет милијарди америчких долара, при чему гљиве овог рода остварују највећи тржишни удео у сегменту медицинских гљива, са пројекцијом даљег убрзаног раста (Seethapathy et al., 2023).

Литературни подаци указују да су за овај род гљива најчешће описиване антитуморска и имуномодулаторна биолошка активност. Антитуморска активност најчешће је праћена изазивањем апоптозе у *in vitro* моделима туморских ћелијских линија, стимулацијом продукције цитокина који посредују у антиканцерогеном одговору

имунског система, инхибицијом пролиферације и супресијом ангиогенезе. Поред проинфламаторних ефеката који учествују у активацији имунског система, имуномодулаторна активност се огледа и у антиинфламаторној активности, описаној, између осталог, у моделима бронхијалне упале. Показана је инхибиторна активност на великом броју ензима, као и антивирусна активност према вирусу ХИВ-а (Paterson, 2006; Seetharathy et al., 2023). Комплексност екстракта природних производа често доводи до варијабилности у уоченим биолошким активностима. Поред тога, појединачне компоненте екстракта могу испољити синергистичке ефекте, због чега је природне производе неопходно посматрати холистички, а не искључиво кроз деловање једног или групе једињења (Paterson, 2006).

У истраживању биолошких активности и медицинских својстава унутар рода *Ganoderma* најчешће су коришћене врсте *G. lucidum* и *G. applanatum*. Упркос широком спектру информација о специјализованим метаболитима овог рода, значајно је мањи обим података о врсти *G. resinaceum*, чији је народни назив „блистава сјајница”. До 2020. године, од укупно 665 секундарних метаболита пријављених за род *Ganoderma* на MEFSAT (*Medicinal Fungi Secondary Metabolites And Therapeutics*) бази података, само 29 једињења потиче од *G. resinaceum*. До 2026. године број описаних ланостанских тритерпеноида је повећан на 43 (Luo et al., 2026). Поред тритерпеноида, ова врста поседује структурно специфичне и потенцијално значајне полисахариде који се разликују од полисахарида других представника овог рода. Структурна карактеризација једињења ове врсте потенцијално може помоћи хемотаксономији овог таксономски комплексног и захтевног рода.

Имајући у виду наведено, постоји јасна потреба за развојем и валидацијом робусних метода хемијског профилисања, како за поступак производње, тако и у вредновању квалитета готових производа.

Употреба методологије дизајна експеримента за оптимизацију процесних параметара (време екстракције, температура, удео појединачних компоненти растварача, однос течност:чврсто, итд.) је описана у литератури (Oludemi et al., 2018; Ruan et al., 2014). Одговор система који је праћен, у већини сличајева је био укупан принос екстракта (Oludemi et al., 2018), а ређе принос одређене компоненте или групе компонената (Ruan et al., 2014). С друге стране, оптимизација смеше растварача у процесу екстракције знатно је мање заступљена, при чему су најчешће проучавани двокомпонентни системи у којима варијаблу представља удео једног од растварача (Oludemi et al., 2018; Ruan et al., 2014).

У циљу контроле квалитета сировине и препарата добијених од плодноносних тела гљива рода *Ganoderma* коришћен је широк спектар хеометријских метода попут анализе главних компоненти (енг. *Principal Component Analysis*, PCA), регресија делимичних најмањих квадрата (енг. *Partial Least Squares Regression*, PLS(R)), хијерархијска анализа кластера (енг. *Hierarchical Clustering Analysis*, HCA), дискриминантна анализа ортогоналних делемичних најмањих квадрата (енг. *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*, OPLS-DA), к-најближих суседа (енг. *k-Nearest Neighbours k-NN*), меко независно моделовање класних аналогича (енг. *Soft Independent Modelling of Class Analogies*, SIMCA), линеарна дискриминантна

анализа (енг. *Linear Discriminant Analysis*, LDA) и сродни приступи. Поред тога, примењиване су и методе машинског учења попут вештачких неуронских мрежа (енг. *Artificial Neural Networks*, ANN), машине са носећим векторима (енг. *Support Vector Machines*, SVM), алгоритам случајних шума (енг. *Random Forest*, RF) и други савремени класификациони и регресиони модели (Gad et al., 2013).

Веза између дизајна експеримента и мултиваријантне анализе одавно је предмет истраживања (Trygg et al. 2007). Ипак, радови који експлицитно интегришу ова два приступа и третирају их као јединствен методолошки оквир и даље су релативно ретки Ellekjær et al., 1996; Ortiz-Pardo et al., 2024). Иако постоје примери примене оваквих стратегија у области хемије природних производа (Foschi et al., 2024), у време писања овог Обраложења нису забележени подаци о примени комбинације дизајна експеримента и мултиваријантних метода на гљивама рода *Ganoderma*. Поред тога, употреба дизајна експеримента, заснована на квалитативним информацијама добијених инструменталним техникама, није недовољно примењивана у пракси.

Основне хипотезе ове докторске дисертације су:

1. Плодоносна тела *G. resinaceum* садрже спектар специјализованих метоболита од потенцијалног фармаколошког и биотехнолошког значаја.
2. Промена услова екстракције утиче на хемијски профил екстракта, а тиме и на његов укупни квалитет.
3. Варијације параметара екстракције могу се на систематичан начин испитати, окарактерисати и оптимизовати применом методологије дизајна експеримента.
4. Спектроскопске и хроматографске технике могу се ефективно применити за добијање квалитативних параметара, компатибилних са методологијом дизајна експеримента.
5. Употреба хеометријских и метода машинског учења може значајно допринети разумевању утицаја промене услова екстракције на квалитет и конзистентност екстракта.
6. Очекивано је да се у оквиру истраживања демонстрира интегрисан радни ток, односно скуп комплементарних алата и метода, адекватних за спровођење овакве студије на лабораторијском нивоу.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Специфични циљеви ове докторске дисертације су:

- Испитивање утицаја услова екстракције на принос и пре свега квалитет екстракта плодноносних тела *Ganoderma resinaceum* применом методологије дизајна експеримента.
- Добијање података о квалитативном саставу екстракта применом хроматографских и спектроскопских техника.
- Дефинисање квалитативних параметара компатибилних са дизајном експеримента.
- Употреба хеометријских приступа и метода машинског учења за утврђивање везе између квалитативних параметара и услова екстракције.
- Изоловање и структурна карактеризација специјализованих метоболита тритерпенског типа.

- Квантификација одабраних метаболита у екстрактима и утврђивање односа између њиховог садржаја и услова екстракције.
- Одређивање биолошке активности екстраката добијених применом методологије дизајна експеримента, зарад корелације за хемијским профилем екстраката. Циљ је корелисати хемијске профиле екстраката са резултатима биолошких активности у *in vitro* тестовима степена инхибиције ензима α -глукозидазе, као циљног теста за полисахариде и 5-LOX (5-липоксигеназа) инхибиторног ефекта, као циљног теста за тритерпене.
- Финална оптимизација услова екстракције на основу комбинације квалитативних и квантитативних критеријума.

Очекивани резултати су:

I. Дизајн експеримента:

- Идентификација најважнијих фактора у процесу екстракције.
- Одређивање магнитуде и смера њиховог утицаја на принос екстракције.
- Добијање екстраката за даљу анализу.

II. Добијање хемијског профила:

- Примена спектроскопских техника, попут инфрацрвене спектроскопије (FTIR) и нуклеарно-магнетне резонантне (NMR) спектроскопије, у циљу добијања интегралне слике о хемијском саставу екстраката.
- Употреба течне хроматографије високих перформанси зарад добијања профила екстраката.
- Добијање квалитативних и семиквантитативних параметара који би са методологијом дизајна експеримента дали могућност оптимизације квалитета екстракта.

III. Хеометрија и машинско учење:

- Тестирање различитих ненадзираних и надзираних метода зарад утврђивања значајности добијених квалитативних и семиквантитативних параметара.
- Упоредивање квалитета изабраних и одабир најпогоднијих метода.
- Утврђивање утицаја услова екстракције кроз горе поменуте параметре.

IV. Изоловање и карактеризација:

- Изоловање тритерпенских и сродних једињења.
- Карактеризација применом NMR спектроскопије.
- Примена изолованих једињења као стандарда за развијање LC/MS/MS панела за њихову идентификацију и квантификацију у екстрактима.

V. Финална оптимизација:

- Интеграција свих квалитативних и квантитативних података.
- Финална оптимизација екстракције кроз различите критеријуме приноса и квалитета.
- Валидација методе.

5. Методе истраживања

У току ове дисертације биће коришћене следеће методе:

- Хроматографске методе: колонска хроматографија, танкослојна хроматографија и танкослојна хроматографија високих перформанси – користиће се за изоловање метаболита и добијање профила екстраката.
- NMR спектроскопија биће коришћена за структурну карактеризацију изолованих једињења, као и праћење разлика у групама једињења унутар екстраката.
- FTIR спектроскопија биће коришћена за утврђивање најзаступљенијих група једињења у екстрактима, као и изолованих једињења. Инфрацрвени спектри ће бити коришћени као улазни подаци у методама мултиваријанте анализе.
- Течна хроматографија високих перформанси спрегнута са масеном спектрометријом (LC-MS) биће коришћена за израчунавање и потврду молекулских формула изолованих једињења, праћење путева њихове фрагментације и квантификацију циљаних једињења унутар екстраката.
- Методе дизајна експеримента које се заснивају на методама одговорних површина – за генерисање матрице експеримената и утврђивање утицаја различитих услова екстракције у виду процесних параметара и удела растварача у смеси.
- Мултиваријантна анализа: надзиране и ненадзиране методе које припадају групама хеометријских метода и метода машинског учења. Биће коришћене зарад утврђивања математичких односа услова екстракције и одговора система у виду квантитативних и квалитативних параметара.
- Инхибиција α -глукозидазе одредиће се спектрофотометријски, праћењем заустављања катализе конверзије *p*-нитрофенил- β -D-глукопиранозида (pNPG) до β -D-глукопиранозида и *p*-нитрофенола. Испитивање инхибиција 5-LOX ензима одредиће се флуорометријском детекцијом интермедијера који се продукује под дејством 5-LOX ензима.

6. Литература

- Ellekjær, M. R., Iseng, M. A., & Næs, T. (1996). A case study of the use of experimental design and multivariate analysis in product improvement. *Food Quality and Preference*, 7(1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/0950-3293\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0950-3293(95)00018-6)
- Foschi, M., Marsili, L., Luciani, I., Gornati, G., Scappaticci, C., Ruggieri, F., D'Archivio, A. A., & Biancolillo, A. (2024). Optimization of the Cold Water Extraction Method for High-Value Bioactive Compounds from Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Flower Heads Through Chemometrics. *Molecules*, 29(20), 4925. <https://doi.org/10.3390/molecules29204925>
- Gad, H. A., El-Ahmady, S. H., Abou-Shoer, M. I., & Al-Azizi, M. M. (2013). Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. *Phytochemical Analysis*, 24(1), 1–24. <https://doi.org/10.1002/pca.2378>

- Luo, Y., Liu, X.-C., Li, Y.-J., Qiu, M.-H., & Peng, X.-R. (2026). Novel triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* attenuate UV-induced photoaging via modulating Nrf2 and MAPK signaling pathways. *Natural Products and Bioprospecting*, 16(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s13659-025-00558-z>
- Oludemi, T., Barros, L., Prieto, M. A., Heleno, S. A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from *Ganoderma lucidum*: Optimization study using the response surface methodology. *Food & Function*, 9(1), 209–226. <https://doi.org/10.1039/C7FO01601H>
- Ortiz-Pardo, N., Fernández-Martínez, T., Urbano, B. F., & Campos-Requena, V. H. (2024). Thiolated nanoclays as a potential mucoadhesive material: Optimization by design of experiments and multivariate regression. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 134, 103803. <https://doi.org/10.1016/j.jadhadh.2024.103803>
- Paterson, R. R. M. (2006). Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67(18), 1985–2001. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.004>
- Ruan, W., Lim, A. H. H., Huang, L. G., & Popovich, D. G. (2014). Extraction optimisation and isolation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their effect on human carcinoma cell growth. *Natural Product Research*, 28(24), 2264–2272. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.938337>
- Seethapathy, P., Sankaralingam, S., Muniraj, I. K., Perumal, M., & Pandurangan, N. (2023). Mass Multiplication, Economic Analysis, and Marketing of *Ganoderma* sp. (Reishi Mushroom). In N. Amaresan, D. Dharumadurai, & O. O. Babalola (Eds.), *Food Microbiology Based Entrepreneurship* (pp. 89–113). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5041-4_6
- Trygg, J., Holmes, E., & Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in Metabonomics. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 469–479. <https://doi.org/10.1021/pr060594q>