

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидата Лоре Тубић, мастер биохемичара, пријављене под насловом „Структурна и функционална карактеризација хидрогелова на бази екстракта црвене микроалге *Porphyridium purpureum*“.

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је формулисање, карактеризација и потенцијална примена хидрогелова на бази екстракта црвене микроалге „*Porphyridium purpureum*“.

3. Основне хипотезе

Хидрогелови су меки материјали који суштински представљају тродимензионалне мреже полимерних ланаца. Могу бити природни и вештачки, као и физички и хемијски умрежени. Све већа предност се даје природним хидрогеловима који су физички умрежени, због њихове биодеградибилности, биокompatibilности и ниже токсичности. Хидрогелови могу да апсорбују и задрже велике количине воде, а да се при томе не растворе и изгубе своју тродимензионалну структуру. По својим реолошким својствима налазе се између чврстих тела и течности, те су за њих карактеристична специфична еластична и вискозна својства. Битно својство структуре хидрогелова је и порозност.

Истакнута предност хидрогелова је могућност подешавања њихових својстава, због чега су и нашли примену у различитим гранама науке и индустрије. Конкретно, у прехранбеној индустрији, употребљавају се за производњу џема, желеа, млечних дезертних производа, кондиторских производа, неких производа од меса као и њихових алтернатива, те нудли и тофу сира. Хидроколоидни системи на бази протеина и угљених хидрата поседују важна технолошка својства, те имају улогу у стабилизацији пене, емулзија и дисперзних система, спречавању формирања кристала леда и шећера, модификовању текстуре производа. Надаље, природни полимерни који имају својство гелирања се у индустрији хране могу искористити и за побољшање сензорних својстава намирница, њихове нутритивне вредности као и продужења рока трајања.¹

Захваљујући својој порозној структури, хидрогелови се могу користити за енкапсулацију различитих биоактивних једињења. Стога, нашли су употребу у циљном испоручивању нутриената и њиховој заштити. На овај начин се могу искористити и као носачи ароматичних супстанци у циљу побољшања сензорних својстава хране.²

Хидрогелови поседују структуру налик ванћелијском матриксу ткива. Из тог разлога се могу користити као калупи за узгајање ћелијских култура, омогућавајући адхезију, пролиферацију и диференцијацију ћелија.²

Наравно, примена хидрогелова се овде не завршава. Могу се употребити за израду материјала који имитирају ткива, сочива, завоје за ране, у различитим козметичким производима, сензорима, третманима отпадних вода, различитим врстама премаза итд.³

P. purpureum је црвена микроалга, интересантна због свог састава. Садржи важне биоактивне компоненте, као што су фикобилипротеини, сулфополисахариди и полинезасићене масне киселине.⁴ Фикобилипротеини се сматрају јаким антиоксидансима, а у овој врсти је доминатно присутан Б-фикоеритрин. Овај протеин има интензивну ружичасту боју, због чега се може користити као пигмент у различитим гранама индустрије.⁵ Сулфополисахаридима из ове микроалге се приписују антиоксидативна, антимикробна и антиканцерогена својства. Поред тога, сматра се да имају благотворно дејство на интестиналну микрофлору, али и да могу довести до смањења нивоа холесетрола у крви пацова.⁶

Утврђено је да *P. purpureum* не садржи познате токсине и додељен јој је GRAS статус (*Generally Recognized As Safe*) од стране управе за храну и лекове Сједињених Америчких Држава (*Food and Drug Administration, FDA*).⁷ Из тог разлога, од интереса је развој хидрогелова на бази ове микроалге који би потенцијално могли наћи употребу у биотехнологији.

4. Циљеви истраживања и очекивани резултати

Главни циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације је развој хидрогелова који ће се добити на брз и једноставан начин, из природних и нетоксичних извора, а који ће притом имати и реолошка и биоактивна својства која им омогућавају даљу примену.

С тим у вези, потребно је одредити састав екстракта микроалге „*P. purpureum*“ који ће се користити за добијање хидрогелова. Затим, потребно је структурно и реолошки окарактерисати хидрогелове. Даље, потребно је испитати и дигестибилност хидрогелова као и антиоксидативну активност добијених дигеста.

У циљу потенцијалне примене хидрогелова, потребно је и испитати могућност њихове употребе као калупа за узгајање ћелијских култура. Затим, ради потенцијалне употребе за енкапсулацију биоактивних једњења потребно је испитати и интеракције Б-фикоеритрина и одабраних лиганата, формирање енкапсулата са одговарајућим лигандима као и тестирање својстава добијених енкапсулата.

Да би се потпуније описао процес гелирања екстракта „*P. purpureum*“, потребно је урадити и карактеризацију сулфополисахарида из екстракта ове микроалге, будући да су они, као и фикобилипротеини, заслужни за овај процес.

Очекивани резултати су добијање интензивно обојених хидрогелова добре конзистенције, који су стабилни током симулиране гастроинтестиналне дигестије, те да се и последично могу користити за развој стабилних енкапсулата биолошки интересантних једињења.

5. Методе истраживања

За припремање хидрогелова користиће се екстракт микроалге „*P. purpureum*“ и натријум алгинат. Способност гелирања ће се тестирати на неколико рН вредности у опсегу од 2 до 5. Екстракт „*P. purpureum*“ ће бити окаректерисан по питању садржаја укупних протеина и угљених хидрата, као и фикобилипротеина и сулфополисахарида. Микроструктура хидрогелова ће бити испитана помоћу скенирајуће електронске микроскопије (*Scanning electron microscopy*, SEM) и конфокалне микроскопије (*Confocal laser Scanning Microscopy*, CLSM). Састав хидрогелова ће бити описан помоћу инфрацрвене спектроскопије (*Fourier-transform infrared spectroscopy* FTIR). Биће испитана и способност упијања воде и способност задржавања воде хидрогелова. Такође, хидрогелови ће бити подвргнути и реолошком испитивању. Тестирана ће бити и *in vitro* дигестибилност и хидрогелова и самог екстракта „*P. purpureum*“, након чега ће се испитати антиоксидативна активност добијених фракција.

У циљу примене хидрогелова, тестираће се њихова способност да се користе као калупи (*scaffolds*) за узгајање ћелијских култура. С тим у вези, провериће се вијабилност ћелија ресазурин есејем.

Затим, испитаће се интеракције доминантног фикобилипротеина из екстракта „*P. purpureum*“, Б-фикоеритрина (В-РЕ), са одабраним полифенолима (кверцетин, ванилин, гална киселина, сиригична киселина, кафеинска киселина, 3,4-дихидроксибензојева киселина, ресвератрол), витаминима (витамин Ц, витамин Б₁, витамин Б₂, витамин Б₉, витамин Б₁₂, ретинол, β-каротен, витамин Д₃) и другим биоактивним молекулима (ментол, коензим Q₁₀, липоинска киселина). Скрининг потенцијалног везивања Б-фикоеритрина са поменутим лигандима радиће се на ELISA читачу са црвеним филтером са емисијом на 530 nm и екситацијом на 590 nm. На флуориметру ће бити испитивано везивање лиганада који су се најбоље показали на скрининг тесту, при чему ће се испитивање вршити у неутралним (рН=7.2) и киселим (рН=3.5) условима.

Стабилност протеина у раствору лиганда и утицај лиганада на његову структуру ће се тестирати помоћу CD спектроскопије (*Circular Dichroism spectroscopy*). Снимаће се спектри у далекој UV области (180-250 nm), блиској UV области (250-350 nm) и видљивом делу спектра (320-750 nm).

У циљу утилизације хидрогелова, урадиће се енкапсулација одабраних лиганада помоћу електроспреј или електроспининг технике. Затим, ради њихове карактеризације, испитаће се ефикасност енкапсулације, стабилност енкапсулата, као и ослобађање компоненти енкапсулата након симулиране *in vitro* дигестије.

Будући да су за гелирање заслужни сулфополисахариди присутни у екстракту „*P. purpureum*“, урадиће се њихово изоловање као и карактеризација.

6. Литература

1. Zhang, H., Zhang, F., & Yuan, R. (2020). Applications of natural polymer-based hydrogels in the food industry. In *Hydrogels based on natural polymers* (pp. 357–410). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00015-X>.
2. Subramanian, K. G., & Vijayakumar, V. (2015). Hydrogels: Classification, synthesis, characterization, and applications. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, 11, 3879-3892. <https://doi.org/10.1201/9781351237970>
3. Peppas, N. A., & Hoffman, A. S. (2020). Hydrogels. In *Biomaterials science* (pp. 153-166). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00014-3>
4. Tsvetanova, F., & Yankov, D. (2022). Bioactive compounds from red microalgae with therapeutic and nutritional value. *Microorganisms*, 10(11), 2290. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112290>
5. Dagnino-Leone, J., Figueroa, C. P., Castañeda, M. L., Youlton, A. D., Vallejos-Almirall, A., Agurto-Muñoz, A., ... Agurto-Muñoz, C. (2022). Phycobiliproteins: Structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1506–1527. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.02.016>
6. de Jesus Raposo, M. F., De Moraes, R. M. S. C., & de Moraes, A. M. M. B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233–252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>
7. U.S. Food and Drug Administration. (n.d.). *New dietary ingredient (NDI) safety information: Porphyridium cruentum*.