

**НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану урађене докторске дисертације Немање Мирковића, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду бр. 33/7-4.12. од 30.03.2016. године, именована је Комисија за оцену урађене докторске дисертације дипл. инж. Немање Мирковића, под насловом "Карактеризација и детерминација бактериоцина аутохтоних лактокока" у саставу: др Зорица Радуловић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Милан Којић научни саветник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, др Миомир Никшић, редовни професор, Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Јелена Лозо, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Драгослава Радин, редовни професор, Пољопривредног факултета Универзитета у Београду. На основу анализе приложене докторске дисертације подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертације дипл. инж. Немање Мирковића под насловом „Карактеризација и детерминација бактериоцина аутохтоних лактокока“ написана је на 135 стране (проред 1,5) у оквиру којих се налази 21 табела, 18 слика и 2 графикона. У докторској дисертацији је цитирано 187 извора литературе. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику, Списак скраћеница, Садржај, Текст по поглављима, Литературу, Изјаве и Биографију аутора. Текст дисертације садржи следећа поглавља: Увод (стр. 1-4), Преглед литературе (стр 5-31), Циљеви рада (стр. 32-33), Материјал и методе (стр. 34-59), Резултати (стр. 60-99), Дискусија (стр. 100-111), Закључци (стр. 112-115) и Литература (116-135). Поред наведеног садржи: Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјаву о коришћењу.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

У поглављу **Увод** кандидат је најпре дао опис општих карактеристика бактерија млечне киселине и антимикуробних супстанци које оне синтетишу, а које су биле предмет његовог истраживања. Кандидат је посебно обратио пажњу на поделу бактериоцина бактерија млечне киселине, где је описао поделу бактериоцина: бактериоцини Класе I

поседују атипичне аминокиселине, које се јављају као резултат посттранслационих модификација серина и треонина. Класи I припадају бактериоцини који носе заједнички назив лантибиотици. Лантибиотици се деле на четири подкласе, од којих су подкласа I и подкласа II најзаступљеније и највише истражене. Лантибиотици подкласе I формирају структуру дугачког ланца и представник им је низин, док лантибиотици подкласе II формирају структуру дугачког репа и прстена, а представници су лактици 481, нукацин ИСК-1 и остали. Бактериоцини Класе II су немодификовани пептиди или пептиди са јако малим модификацијама. Класа II бактериоцина је подељена на четири подкласе: педиоцин-слични бактериоцини (IIa); дипептидни бактериоцини (IIб); циклични бактериоцини (IIц); линеарни бактериоцини који не личе на педиоцин-сличне бактериоцине (IIд). Кандидат је посебну пажњу обратио на бактериоцине који су продуковани од стране аутохтоних лактокока, као и на њихов спектар антимикуробног деловања и примене у прехранбеној индустрији. На крају уводног дела докторант је указао на опште особине патогене бактерије *Listeria monocytogenes*, са освртом на проблеме које изазива у производњи различитих сирева, као што су сиреви са дугим зрењем, меки сиреви, сиреви од ултрафилтрираног млека у саламури. Такође, докторант је указао на потенцијалну примену до сада окарактерисаних бактериоцина у производњи сирева, у циљу контроле *L. monocytogenes*. До сада је окарактерисан велики број бактериоцина, али само неколицина, међу којима су педиоцин АсН/РА-1, лактицин 3147 и неки ентероцини су показали добре резултате у контроли *L. monocytogenes* током производње сира. С обзиром на сталну тежњу да се окарактеришу нови бактериоцини, истакнут је и допринос резултата његове докторске тезе у идентификацији нових бактериоцина јер је докторант открио нови бактериоцин, као и бактериоцин са антилистеријалном активношћу.

Поглавље **Преглед литературе** се састоји од девет (9) подпоглавља у којима су описани до сада објављени резултати других аутора који су директно или индиректно везани за предмет проучавања ове докторске дисертације, као и за методолошке приступе који су коришћени. Прво подпоглавље почиње са разматрањем основних карактеристика бактерија млечне киселине, њихових најзначајнијих родова који су остварили примену у прехранбеној индустрији, са посебним освртом на род лактокока (*Lactococcus*), с обзиром на то да је највећи комерцијално доступних бактериоцина синтетисано од стране наведеног рода. У наредном подпоглављу, **Антимикуробна једињења бактерија млечне киселине** (БМК), описана су сва, до сада описана, једињења БМК (органске киселине, диацетил, угљен диоксид, водоник пероксид, масне киселине), као и њихова потенцијална примена и антимикуробни спектар деловања. У подпоглављу, **Бактериоцини**, на основу литературних података кандидат је дао информације о историјском развоју истраживања у области бактериоцина, као и једну општу дефиницију бактериоцина која обухвата најшире оквире пептидних антимикуробних компоненти. С обзиром да бактериоцини испољавају антимикуробно деловање слично антибиотцима кандидат је навео све параметре који их међусобно разликују. Поред тога, наведени су литературни подаци који подржавају употребу бактериоцина као презерватива хране као и предности које их препоручују као агенсе за употребу као терапеутика било самостално или у садејству са антибиотцима. Кандидат је кроз литературне наводе дао историјски преглед класификације бактериоцина почев од прве 1993 до најновије где су сви до сада описани бактериоцини сврстани у две групе. Кандидат је истакао предности и мане различитих класификација и посебну пажњу посветио класификацији коју су предложили Rea et al. (2011), а коју је користио у даљем

раду пошто најадекватније описује и класификују бактериоцина БМК. Након тога је детаљно описао сваку групу бактериоцина почев од представника који је чине, затим структуре полипептида, да ли има посттранслационо модификоване аминокиселине, који су све гени укључени у синтезу бактериоцина, гени за имуност и механизме деловања. У подпоглављу, **Изолација и пречишћавање бактериоцина**, кандидат је писао о методама изолације бактериоцина које продукују БМК. До сада су описана три начина изолације бактериоцина БМК: први начин подразумева методу таложења протеина коришћењем амонијум-сулфата, а наставља се неким типом хроматографије и на крају се завршава реверзно-фазном течном хроматографијом високих перформанси (RP-HPLC); други начин се заснива на таложењу протеина амонијум-сулфатом, а затим следи екстракција протеина хлороформом или метанолом, а као додатно пречишћавање се користи HPLC; трећи начин подразумева подешавање рН вредности медијума у којем је расла бактеријска култура, а концентracија бактериоцина је доведена до максимума, а некон тога се користи хидрофобна хроматографија. Која од наведених метода ће бити коришћена, зависи од врсте бактериоцина и углавном се одабир метода одређује емпиријски. Биохемијске методе за добијање чистих бактериоцина све чешће се користе у утврђивању њихове потенцијалне примене у конзервационој хране. У наредном подпоглављу, **Примена бактериоцина**, кандидат је на основу литературних података, писао о ширењу бактеријских резистенција на антибиотике, као и о тежњи за проналажење антимикуробних једињења која ће бити алтернатива за антибиотике. Први велики помак у истраживању, било је откривање низина. На основу механизма деловања низина, могу се направити нови антибиотици који ће се везивати за циљни молекул и испољавати своју антимикуробну активност. Поред тога што су механизми деловања бактериоцина искоришћени за прављење нових антибиотика, бактериоцини се могу користити и као алтернатива за антибиотике. До сада су низин и лактицин 3147 показали изузетне резултате на ванкомицин и оксацилин резистентне бактерије. Услед потребе да се храна сачува за дужи временски период у прехрамбеној индустрији се храни додају конзерванси хемијске природе који дуготрајним уношењем могу испољити негативне ефекте на здравље људи и животиња. Из наведених разлога појавила се потреба за налажењем молекула који могу бити ефикасни презервативи хране а да не испољавају негативне ефекте на конзументе тако да су бактериоцини постали једни од најобезбедјенијих кандидата. Тако су два бактериоцина већ нашла примену у конзервирању хране: низин под комерцијалним именом „Nisaplin“, а педиоцин PA1 као „ALTA2431“. У последњем подпоглављу, **Антилистеријски ефекат бактериоцина**, кандидат је описао опште карактеристике бактерије *Listeria monocytogenes*. На основу литературних података, дао је информације о забележеним случајевима инфекције са смртним исходима, које изазива овај опортунистички патоген. У даљем тексту, описао је прехрамбене производе који могу бити контаминирани листеријом, као и начине доласка у контакт овог патогена са прехрамбеним производима. На крају овог подпоглавља, кандидат је дао примере примене бактериоцина у различитим прехрамбеним производима, са посебним освртом на сиреве. У поглављу **Циљ рада**, кандидат је истакао неколико циљева: прво је за циљ поставио изолацију и карактеризацију сојева лактокока са антимикуробним потенцијалом и њихова идентификација коришћењем класичних и молекуларних метода детерминације до нивоа врсте. Даље, утврђивање присуства бактериоцина код тестираних сојева. У циљу карактеризације испитиваних бактериоцина, за циљ је поставио одређивање локације гена одговорног за синтезу бактериоцина код сојева који су бактериоцин позитивни. Такође,

наводи се да је један од циљева биохемијска карактеризација и утврђивање спектра антимикробног деловања испитиваних бактериоцина. На крају, последњи циљеви су изолација и пречишћавање бактериоцина које продукују бактериоцин позитивни сојеви, као и испитивање антилистеријског деловања бактериоцина соја *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 у модел систему сира. За сваки од циљева кандидат је представио адекватну методологију која омогућује корак по корак долазак до резултата који тачно дефинишу сваки од циљева.

У поглављу **Материјал и методе**, кандидат је описао велики број метода које је користио током израде тезе. У подпоглављима везаним за рад са живим бактеријама кандидат је најпре набројао медијуме који су коришћени за раст различитих сојева бактерија, затим методе за изолацију аутохтоних лактокока и методе које су коришћене за њихову карактеризацију и селекцију. Након карактеризације, кандидат наводи методе које је користио за идентификацију селектованих изолата, односно API систем и молекуларне методе. У наставку кандидат наводи сојеве бактерија, плазида и конструктора коришћених у овом раду. Даље су приказане коришћене методе за припрему компететних ћелија за трансформацију различитих сојева *E. coli* и лактокока. Такође, приказане су методе чишћења плазида селекционисаних сојева лактокока. У подпоглављима везаним за коришћену методологију за рад са ДНК описане су коришћене методе: за изолацију тоталне и плазмидне ДНК из различитих сојева бактерија и методе њеног пречишћавања, дигестије ДНК рестрикционим ензимима, лигације ДНК фрагмената, конструкција плазмидних вектора, умножавање ДНК методом ланчане полимеризације (PCR), метода место специфиче мутагенезе гена, електрофорезе ДНК (класична хоризонтална и у пулсирајућем пољу), методе припреме ДНК, пренос на најлонску мембрану и Southern хибридизација са обележеним ДНК пробама, методе секвенцирања ДНК (класична по Сангеру и секвенцирање нове генерације целокупних генома). У подпоглављима испитивања биохемијских карактеристика бактериоцина одабраних сојева, приказане су методе тестирања антимикробне активности бактериоцина након њихове инкубације на различитим температурама, различитим рН вредностима и третманима различитим ензимима. У подпоглављима рада са протеинима, приказане су методе амонијум сулфатне преципитације бактериоцина испитиваних сојева, пречишћавања бактериоцина (RP-HPLC) и одређивање молекулске масе пречишћеног бактериоцина (LC-MS ESI-TOF). На крају, у подпоглављима испитивања антилистериског ефекта бактериоцина соја *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4, праћен је број ћелија соја *Listeria monocytogenes* ATCC19111 у присуству испитиваног бактериоцина у GM17 бујону и модел систему сира, коришћењем класичних микробиолошких метода и селективне подлоге за *Listeria monocytogenes*.

Резултати истраживања приказани су у два поглавља и већи број подпоглавља с обзиром да је кандидат обрадио добијене резултате добијене из две посебне целине: Изолација и идентификација лактокока бактериоцин-продуцентата и Карактеризација бактериоцина испитиваних сојева. У поглављу **Изолација и идентификација лактокока бактериоцин-продуцентата**, кандидат наводи да је изоловано укупно 52 природна изолата чистих култура, од којих је 9 изолата показало способност продукције бактериоцина. На основу интезитета бактериоцинске активности, одбарано је три природна изолата за даљи рад (BGBM50, LMG2081 и BGBU1-4). Коришћењем API система и молекуларних метода (умножавањем дела конзервираног региона гена 16S rDNA) сва три природна изолата су идентификована као *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. У наредном поглављу, **Карактеризација**

бактериоцина испитиваних сојева, кандидат приказује резултате спектра антимикубног деловања испитиваних бактериоцина, при чему је показано да су бактериоцини сојева BGBM50 и LMG2081 уског спектра деловања, ограничено само на лактококе, док бактериоцин соја BGBU1-4 показује шири спектар деловања, на *Listeria monocytogenes* ATCC19111 и *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* HN14. У подпоглављу, **Карактеризација бактериоцина соја *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50**, након експеримената чишћења плаزمиде соја BGBM50, показано је да се гени за синтезу и транспорт бактериоцина, као и гени одговорни за имуност на исти, налазе на плазмиду од 145,5 kb. Бактериоцин соја BGBM50 је назван ВасВМ50. Даље, кандидат је приказао резултате испитиваних биохемијских карактеристика бактериоцина ВасВМ50 при чему је показано да је испитивани бактериоцин задржава 50% активности након инкубације на температури од 90°C током 60 мин. Испитивањем активности бактериоцина ВасВМ50 након третмана у опсегу рН вредности од 1-12, показано је да испитивани бактериоцин задржава 60% активности након третмана на рН вредности 1. На крају испитивања биохемијских карактеристика бактериоцина ВасВМ50, кандидат приказује резултате деловања протеолитичких ензима на испитивани бактериоцин, при чему испитивани бактериоцин потпуно губи активност. Тестирањем антимикубног спектра деловања бактериоцина ВасВМ50, кандидат је установио да испитивани бактериоцин делује само на лактококе. У циљу идентификације бактериоцина ВасВМ50, кандидат је испитивао присуство специфичних гена за синтезу бактериоцина PCR методом, коришћењем прајмера за најчешће лактококалне бактериоцине. Након анализе резултата, кандидат је идентификовао ВасВМ50 као лактококцин Г бактериоцин. У наредном подпоглављу, **Карактеризација бактериоцина соја *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG2081**, кандидат је представио резултате унакрсних бактериоцинских тестова сојева BGBM50 (лактококцин Г продуцент) и LMG2081 (лактококцин Г продуцент), при чему је показано да сој LMG2081 инхибира раст соја BGBM50. Упоредном анализом секвенце генома ова два соја, кандидат је установио да оба соја поседују комплетне опероне за синтезу бактериоцина лактококцина Г. Даљом анализом генома соја LMG2081, у контигу 62 је пронађен део оперона за синтезу потенцијално новог, до сада некарактерисаног, бактериоцина. Методом инверзног PCR, коришћењем прајмера конструисаних на основу познате секвенце контига 62, састављен је цео оперон (назван lctLMG), а налази се на фрагменту величине 8 kb. На основу претраживања банке података, установљено је да се оперон lctLMG састоји од шест оквира читања названи *lmgA*, *lmgM*, *lmgT*, *lmgF*, *lmgE* и *lmgG*, а који су одговорни за синтезу и транспорт бактериоцина, као и за имуност на исти. *In silico* анализом, утврђено је да се низводно од оперона lctLMG налази секвенца која кодира ДНК-инвертазу, док регион који се налази испред оперона lctLMG није испитан. У циљу потврде да сој LMG2081 синтетише бактериоцин лактококцин Г и нов бактериоцин (назван лактицин LMG), конструисани су „knock-out“ мутанти, LMG2081/ pG⁺hostLcnG (Δ lcnG) и LMG2081/ pG⁺hostlctLMG (Δ lctLMG). Након бактериоцинских тестова, резултати указују да је мутант LMG2081/ pG⁺hostlctLMG изгубио способност деловања на сој BGBM50, чиме је кандидат недвосмислено потврдио да сој LMG2081, поред синтезе лактококцина Г, синтетише и новооткривени бактериоцин лактицин LMG. Кандидат је у наставку представио резултате пречишћавања бактериоцина у циљу одређивања молекулске масе. Након пречишћавања амонијум-сулфатног преципитата супернатанта преконоћне културе соја LMG2081, активност пречишћене фракције је тестирана бактериоцинским тестовима, а као индикатор сој је коришћен сој BGBM50. Добијена

молекулска маса пептида у активној фракцији је 2759 Da, што је у апсолутној корелацији са претпостављеном молекулском масом испитиваног бактериоцина, добијена на основу аминокиселинске секвенце. Анализом добијене молекулске масе и аминокиселинске секвенце, кандидат је установио да се бактериоцин лактицин LMG разликује од свих до сада окарактерисаних бактериоцина, а да је најсличнији бактериоцинима Класе I, група лактицин-481. Кандидат је представио резултате биохемијских карактеристика лактицина LMG, на основу којих се може установити да је испитивани бактериоцин задржава готово 100% активности након инкубације на 100°C током 60 мин. Такође, испитивањем утицаја различитих рН вредности на активност бактериоцина, установљено је да је бактериоцин задржава 60% активности на рН вредности 1 и скоро 80% вредности на рН вредности 12. Испитивањем утицаја ензима на деловање лактицин LMG, кандидат је показао да једино протеолитички ензими имају утицај на активност испитиваног бактериоцина. У последњем подпоглављу, **Карактеризација бактериоцина соја *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4**, кандидат је представио резултате испитивања бактериоцина са антилистеријским деловањем. Испитивањем антимикуробног спектра деловања бактериоцина соја BGBU1-4, кандидат је установио да испитивани бактериоцин има способност инхибиције раста листерије, лактобацила и великог броја лактокока. У циљу локализације гена за синтезу, транспорт и имуност на поменути бактериоцин у соју BGBU1-4, урађени су експерименти чишћења плаزمида, након чега су добијена 2 интересантна деривата BGBU1-4/8 и BGBU1-4/29I. Дериват BGBU1-4/8 је изгубио способност деловања на *Listeria monocytogenes* ATCC19111, док је задржао активност деловања на индикатор сој *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596, а сензитиван је на деловање соја BGBU1-4. Други дериват BGBU1-4/29I је изгубио способност деловања како на *Listeria monocytogenes* ATCC19111, тако и на *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGMN1-596, а сензитиван је на деловање соја BGBU1-4, као и на деловање првог деривата BGBU1-4/8. Провера порекла деривата је урађена коришћењем PFGE методе са *Sma*I ензимом. На основу представљених резултата, кандидат је недвосмислено закључио да сој BGBU1-4 поседује најмање два бактериоцина чији се гени одговорни за синтезу, транспорт и имуност, лоцирани на два различита плаزمида. Антилистеријални бактериоцин соја BGBU1-4 је именован као лактолистерин BU1-4. Испитивањем биохемијских карактеристика лактолистерина BU1-4, кандидат је установио да испитивани бактериоцин задржава 50% активности након третмана на температури од 80°C током 10 мин, док на вишим температурама потпуно губи активност. Такође, кандидат је показао да лактолистерин BU1-4 задржава чак 89% активности након третмана на рН вредности од 12 и 67% активности након третмана на рН вредности од 1. Након третмана лактолистерина BU1-4 различитим ензимима, кандидат је на основу резултата установио да је лактолистерин BU1-4 осетљив на деловање великог броја протеолитичких ензима. На основу резултата испитивања биохемијских карактеристика лактолистерина BU1-4, кандидат је указао да се овај бактериоцин може користити у различитим срединама. Из тог разлога, кандидат је представио резултате антилистеријске активности лактолистерина BU1-4 у GM17 бујону, као прелиминарни тест, а затим је представио резултате испитивања његове антилистеријске активности у модел систему сира. На основу резултата добијених резултата испитивања лактолистерина BU1-4 у GM17 бујону, кандидат је установио да овај бактериоцин одржава број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 на нивоу почетном нивоу током инкубације на 37°C током свих 48 сати. Кад је у питању негативна контрола, у којој је коришћен дериват BGBU1-

4/29I, број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 расте током 48 сати инкубације на 37°C, финално за чак 3,5 log cfu/mL. У присуству бактериоциноског препарата низина, број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 опада током целог периода инкубације, Финално, бележи се пад од готово 4 log cfu/mL. Даље тестирање је било усмерено на испитивање антилистеријске активности лактилистерина BU1-4 у модел систему сира, при температурним условима који су значајни у процесу производње и складиштења сира. Током симулираних процеса коагулације сира, ферментације и складиштења, кандидат је показао да лактолистерин BU1-4 одржава број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 на почетном нивоу. У негативној контроли, у којој је коришћен дериват BGBU1-4/29I, у току првих 24 сата на 18°C број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 расте за 0,8 log cfu/g. Тај тренд се наставља и током 7 дана инкубације модел система сира на температури од 12°C. У варијанти са низинским препаратом, број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 опада за 0,7 log cfu/g, током првих 24 сата на 18°C. Након инкубације модел система сира на 12°C током 7 дана, бележи се блажи пад броја ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111, за око 0,4 log cfu/g. У току периода складиштења модел система сира на 4°C током 21 дан, у негативној контроли број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 расте током целог периода складиштења, док у присуству лактолистерина BU1-4 и низина, број ћелија *L. monocytogenes* ATCC19111 остаје непромењен.

У поглављу **Дискусија**, кандидат је подробно дискутовао добијене резултате и поредио са литературним подацима других аутора. Значај сваког приступа и добијених резултата је истакнут у овом поглављу са истицањем предности приступа који су коришћени у добијању резултата ове тезе. Поглавље **Дискусија** у докторату је сходно концепту добијених резултата (из три различита соја) подељено на три подпоглавља. У подпоглављу, **Бактериоцин ВасВМ50**, истакнута је способност природног изолата да синтетише изузетно потентан бактериоцин чији се гени одговорни за синтезу, транспорт и имуност налазе на изузетно великом плазмиду од 145,5 kb. Кандидат је дискутовао о различитим бактериоцинима чији се генетски материјал одговоран за њихову синтезу налази на плазмидима. Такође, испитивањем биохемијских карактеристика ВасВМ50, кандидат је упоредио и дискутовао о биохемијским карактеристикама до сада окарактерисаних бактериоцина. Након идентификације бактериоцина ВасВМ50 као лактокоцина Г, коришћењем комбинације PCR методе са специфичним прајмерима за синтезу већ познатих бактериоцина, кандидат дискутује о налажењу лактококцин Г у различитим стаништима и на различитим територијама. Упоредије тај феномен са осталим бактериоцинима који се могу налазити на различитим стаништима и дискутује о могућим разлозима за те феномене. На крају, кандидат дискутује о ограничениости антимикробног деловања лактококцина Г само на лактококе и могућностима његове примене у прехранбеној индустрији као биохранванса хране. У наредном подпоглављу, **Бактериоцин лактицин LMG**, кандидат дискутује о новооткривеном бактериоцину, лактицин LMG, који припада Класи I бактериоцина, групи лактицин-481. Кандидат упоредије аминокиселинску секвенцу сваког гена оперона *lctLMG* са најсличнијим опероним ове групе бактериоцина и дискутује о њиховим разликама. Даље, на основу молекуларске масе лактицин LMG, кандидат дискутује о предикцији посттранслационих модификација које се догађају у случају овог бактериоцина. Кандидат је посебну пажњу посветио дискусији о феномену који откривен у соју *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LMG2081, да један сој има способност синтезе два бактериоцина који припадају различитим класама, што је први забележен случај код лактокока. На крају, кандидат

дискутује о биохемијским карактеристикама бактериоцина лактицин LMG, упоређујући добијене резултате са литературним подацима добијених за бактериоцине из исте групе. С обзиром да лактицин LMG показује јако добре биохемијске особине, а да му је спектар антимикробног деловања ограничен само на лактоке, кандидат је на крају дискутовао о могућностима проширивања спектра антимикробног деловања овог бактериоцина на патогене сојеве, као и о његовој потенцијалној примени у бржем сазревању сирева са дугим зрењем. У последњем подпоглављу, **Бактериоцин лактолистерин ВU1-4**, кандидат описује основне карактеристике патогене бактерије *Listeria monocytogenes*, проблеме које задаје у прехранбеној индустрији и мерама превентиве за контролу овог патогена, са посебним освртом на коришћење бактериоцина бактерија млечне киселине. У наставку, кандидат описује сој *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ВGBU1-4 који има способност синтезе два бактериоцина, од којих један, лактолистерин ВU1-4, показује антилистеријски ефекат. Кандидат упоређује биохемијске карактеристике лактолистерина ВU1-4, са осталим, до сада окарактерисаним бактериоцинима са антилистеријским деловањем и констатује да лактолистерин ВU1-4 поседује изузетне биохемијске карактеристике. У наставку, на основу резултата антилистеријског деловања лактолистерина ВU1-4 у GM17 бујону и модел систему сира, кандидат дискутује о могућој примени лактолистерина ВU1-4 као биоконзерванса у производњи белог сира од ултрафилтрираног млека. С обзиром да лактолистерин ВU1-4 показује бактериостатички ефекат у односу на *L. monocytogenes* у моделу систему сира, кандидат на основу литературних података дискутује о могућим начинима појачавања тог ефекта.

У поглављу **Закључак**, на основу анализе добијених резултата кандидат је извео закључке на основу којих је утврђено да су остварени циљеви докторске дисертације.

На основу резултата кандидат је закључио да су од 52 изолована аутохтона соја лактокока, на основу бактериоцинске активности одабрана три соја ВGBM50, LMG2081 и ВGBU1-4 која су идентификована као *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Чишћење плаزمида се показало као поуздана метода у утврђивању локације гена за синтезу бактериоцина, а на основу ове методе закључено је да се генетичке детерминанте за синтезу бактериоцина код соја ВGBM50 налазе на плазмиду.

PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) анализом је закључено да је плазмид на којем се налазе генетичке детерминанте за синтезу бактериоцина у соју ВGBM50 величине 145,5 kb.

Коришћењем већих броја специфичних прајмера који мапирају у генима који кодирају познате бактериоцине, закључено је да сој ВGBM50 синтетише лактококцин Г.

Испитивањем биохемијских карактеристика, закључено је да лактококцина Г задржава максималну активност у температурном опсегу од 40°C-80°C, да задржава чак 80% активности на вредности рН 12 и да је осетљив на деловање протеолитичких ензима.

Анализом секвенце генома и унакрсним бактериоцинским тестовима са сојем *L. lactis* ssp. *lactis* ВGBM50, закључено је да сој *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081, поред синтезе лактококцина Г, синтетише још један бактериоцин.

Методом инверзног PCR-а, склопљен је цео оперон за синтезу непознатог бактериоцина и закључено је да се тај оперон (lctLMG) састоји од шест оквира читања названи *lmgM*, *lmgT*, *lmgF*, *lmgE*, *lmgG* и да има највише сличности са оперонима бактериоцина који припадају лантибиотицима лактицин-481 групе.

Конструкцијом инсерционих мутаната, закључено је да сој *L. lactis* ssp. *lactis* LMG2081 поседује два функционална оперона за синтезу лактококцина Г (Класа II) и новооткривеног бактериоцина лактицина LMG, који припада Класи I бактериоцина.

Анализом молекулске масе, коришћењем MS/HPLC методе, закључено је да маса лактицина LMG износи 2759 Da, што је омогућило прецизно мапирање места исецања и формирања активног бактериоцина од 25 аминокиселина.

Закључено је да се оперон за синтезу бактериоцина лактицина LMG налази на плазмиду од 115 kb, а оперон за синтезу бактериоцина лактококцина Г на хромозому.

Лактицин LMG је изузетно термостабилан, задржава 90% активности на температури од 100°C након 60 мин. Активан је у опсегу вредности рН 1-12, али максимум активности показује у опсегу вредности рН 5-10. Осетљив је на деловање протеолитичких ензима и уског је спектра деловања.

Закључено је да сој *L. lactis* ssp. *lactis* BGBU1-4 синтетише бактериоцин са широким спектром антимикубног деловања, на лактококе, лактобациле, као и на *Listeria monocytogenes*.

Чишћењем плаزمида, добијене су две групе деривата BGBU1-4/8 (делује на лактококе али не делује на *L. monocytogenes*) и BGBU1-4/29I (нема бактериоцинске активности) на основу чега је закључено да сој BGBU1-4 синтетише најмање два бактериоцина и да се генетички елементи за синтезу оба бактериоцина налазе на различитим плазмидима.

Бактериоцин лактолистерин BU1-4 је термостабилан, своју активност показује у опсегу од 40°C-80°C, при чему на температури од 80°C након икубације од 30 и 60 мин губи активност. Задржава 100% активности у опсегу вредности рН 4-10, при чему при вредности рН 12 задржава чак 90% активности, а при вредности рН 1 задржава 70% активности. Осетљив је на деловање протеолитичких ензима.

Анализом активности лактолистерина BU-4 у GM17 бујону, закључено је да показује бактериостатички ефекат на *L. monocytogenes* ATCC19111, чији се број ћелија одржао на нивоу од 5 log cfu/mL током 48 сати.

Анализом активности лактолистерина BU1-4 у модел систему сира, закључено је да показује бактериостатички ефекат на *L. monocytogenes* ATCC19111 при температурним режимима процеса производње и складиштења.

У поглављу **Литература** наведен је списак од 187 референци. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива сва поља истраживања и разматрана питања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Немање Мирковића, дипл. инж. под насловом "Карактеризација и детерминација бактериоцина аутохтоних лактокока" представља оригиналан научни рад чији резултати имају фундаментални а и практични значај у области изучавања бактериоцина и њихове примене у прехранбеној индустрији као биоконзерванаса хране. Тема докторске дисертације је изузетно актуелна, на самом почетку кандидат је систематски проучио доступне резултате других аутора, добро дефинисао предмет и програм истраживања, поставио исправне циљеве, затим је одабрао адекватну методологију за остварење задатих циљева.

Добијени резултати представљају новооткривен бактериоцин, као и феномен у којем један сој има способност синтезе два бактериоцина који припадају различитим класама, што је

результат светског значаја с обзиром на актуелност и применљивост како резултата тако и коршћене методологије у будућим истраживањима. Актуелност резултата ове тезе је потврђена квалитетом часописа у којима су публиковани (један рад у часопису M22 категорије а други рад у часопису M21 категорије).

Истраживања приказана у овој докторској дисертацији су урађена у сагласности са планом и програмом који је предложен у Пријави докторске дисертације.

На основу свега изнетог у овом извештају, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Немање Мирковића, дипл. инж. под насловом „Карактеризација и детерминација бактериоцина аутохтоних лактокока” и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

У Београду, 05.05.2016.

Чланови Комисије:

др Зорица Радуловић, ванредни професор (Технолошка
микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Милан Којић, научни саветник (Молекуларна
генетика и генетичко инжењерство)
Институт за молекуларну генетику и генетичко
инжењерство, Универзитет у Београду

др Миомир Никшић, редовни професор (Технолошка
микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Јелена Лозо, ванредни професор (Биохемија и
молекуларна биологија)
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Драгослава Радин, редовни професор (Технолошка
микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Радови објављени у научним часописима са SCI листе који су проистекли из докторске дисертације Немање Мирковића, под насловом ”Карактеризација и детерминација бактериоцина аутохтоних лактокока”.

Mirkovic, N., Radulovic, Z., Uzelac, G., Lozo, J., Obradovic, D., Topisirovic, Lj., Kojic, M. (2015): Isolation and characterisation of bacteriocin and aggregation-promoting factor production in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BGBM50 strain. Food Technology and Biotechnology 53: 237-242.

Mirkovic, N., Polovic, N., Vukotic, G., Jovic, B., Miljkovic, M., Radulovic, Z., Diep., B. D., Kojic, M. (2016): *Lactococcus lactis* LMG2081 produces two bacteriocins: a non-lantibiotic and a novel lantibiotic. Applied and Environmental Microbiology, doi:10.1128/AEM.0398815