

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 13.07.2021. године, на основу молбе ментора др Сање Јеремић, вишег научног сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације докторанда **Мине М. Мандић**, истраживача сарадника Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, под насловом: „**Биотехнолошки значајни ензими из сојева рода *Pseudomonas*: Идентификација и рекомбинантна експресија лаказа и липаза**“, у саставу:

1. др Сања Јеремић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду;
2. др Јасмина Никодиновић-Рунић, научни саветник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду;
3. др Ђорђе Фира, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет;
4. др Горан Вукотић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Мине М. Мандић** под насловом „**Биотехнолошки значајни ензими из сојева рода *Pseudomonas*: Идентификација и рекомбинантна експресија лаказа и липаза**“, представља оригинално истраживање које за тему има идентификацију нових ензима лаказа и липаза пореклом из сојева рода *Pseudomonas*, њихову рекомбинантну експресију, функционалну карактеризацију, као и испитивање потенцијала за њихову примену у биотехнологији и биоремедијацији.

Ова докторска дисертација реализована је у Лабораторији за молекуларну генетику и екологију микроорганизама, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Изучавање микробиолошког диверзитета и карактеризација корисних срединских микроорганизама (ОИ 173048)“. Део експеримената урађен је у Биотехнолошкој лабораторији Школе за хемијско инжењерство Националног Техничког Универзитета у Атини, Грчка.

Докторска дисертација написана је на 128 страна (проред 1) и садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о ментору и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима, Списак литературе и Прилоге у оквиру којих се налази 40 слика и 8 табела. У докторској дисертацији су цитирана 363 извора литературе. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (стр. 1-26); **Циљеви** (стр. 27-28); **Материјал и методе** (стр. 29-54); **Резултати** (стр. 55-76); **Дискусија** (стр. 77-86); **Закључци** (стр. 87-88); **Литература** (стр. 89-114); **Прилози** (стр. 115-128). Поред наведеног, приложени су: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи пет потпоглавља. У њему су сажето приказани подаци из литературе који су непосредно повезани са темом докторске дисертације.

У потпоглављу „Род *Pseudomonas*“ истакнут је велики диверзитет поменутог рода, метаболичка разноврсност и отпорност на различите абиотичке и биотичке факторе који овим бактеријама омогућавају широку распрострањеност у различитим еколошким нишама. Потпоглавље „Значај врста рода *Pseudomonas* у биотехнологији“ истиче изузетан значај врста овог рода, као и њихових ензима за примену у различитим биотехнолошким процесима. Описане су предности коришћења целих ћелија и ензима у биотехнологији у односу на хемијске катализаторе. Истакнуто је да су врсте овог рода добар извор оксидаза, липаза, протеаза и других ензима значајних за биокаталитичке процесе. Наведене су врсте овог рода које су у данашње време најчешће у употреби у различитим гранама индустрије. Потпоглавље „Значај врста рода *Pseudomonas* у заштити животне средине“ истиче способност врста рода *Pseudomonas* да разграде различита једињења, загађиваче животне средине, што их чини погодним за примену у биоремедијацији. Дати су подаци о врстама за које је показано да врше трансформацију токсичних супстанци које су присутне у контаминираним срединама. Истакнуто је и да поједине врсте рода *Pseudomonas* могу да разграђују пластични отпад различитог порекла.

Потпоглавље „Лаказе“ је подељено на осам одељака: „Извори и биолошка улога лаказа“, „Структура лаказа“, „Активно место лаказа и механизам ензимске катализе“, „Медијатори лаказа“, „Супстрати за лаказе“, „Биохемијска карактеризација лаказа“, „Значај ензима лаказа у биотехнологији и биоремедијацији“ и „Примена лаказа у разградњи боја“. У првом одељку наведене су основне одлике широко распрострањених оксидативних ензима лаказа који спадају у групу мулти-бакар оксидаза, извори и њихове различите биолошке улоге у одбрани организма од стреса, морфогенези, оксидацији токсина, пигментацији, спорулацији, хомеостази бакра и другим процесима. Одељак „Структура лаказа“ описује присуство специфичних купредоксинских домена код до сада проучених ензима лаказа. Наводи се да ови ензими могу имати мономерну, хомодимерну, хетеродимерну и мултимерну структуру. У одељку „Активно место лаказа и механизам ензимске катализе“ истиче се да се активно место карактеристично за

ензиме лаказе састоји од четири бакарна јона који су класификовани у три типа – Тип 1, Тип 2 и Тип 3. Ови бакарни јони формирају два центра – мононуклеарни и тринуклеарни, који су кључни за каталитички механизам лаказа, односно интеракцију са супстратом. Детаљно је описан механизам ензимске катализе који подразумева оксидацију супстрата и редукцију молекулског кисеоника до воде. Одељци „Медијатори лаказа“ и „Супстрати за лаказе“ наводе да лаказе оксидују широк спектар ароматичних и других једињења, а да се посредством редокс медијатора, опсег супстрата ових ензима може проширити на једињења која имају велику молекулску масу или виши редокс потенцијал од самог ензима. У одељку „Биохемијска карактеризација лаказа“ дат је упоредни преглед температурних и рН оптимума ензима лаказа код различитих врста, а описана је и термостабилност, као и дејство различитих инхибитора на њихову активност. Одељак „Значај ензима лаказа у биотехнологији и биоремедијацији“ истиче велики значај ових ензима као биокатализатора у различитим биотехнолошким процесима, као и процесима уклањања различитих загађивача из животне средине. Истакнуте су предности употребе бактеријских лаказа у односу на фунгалне и наведене врсте чији су ензими у употреби у индустрији и биоремедијацији. „Примена лаказа у разградњи боја“ је одељак који описује велики потенцијал ензима лаказа за биоремедијацију отпадних вода контаминираних постојаним бојама из текстилне индустрије.

Потпоглавље „Липазе“ чини осам одељака: „Извори и биолошка улога липаза“, „Структура липаза и механизам ензимске катализе“, „Бактеријске липазе“, „Механизми секреције бактеријских липаза“, „Биохемијска карактеризација липаза“, „Селективност липаза“, „Значај ензима липаза у биотехнологији и биоремедијацији“ и „Примена липаза у биоразградњи полимера“. Последњи одељак подељен је на седам пододељака: „Биоразградиви полимери као алтернатива пластици“, „РНА полимери“, „Биоразградња РНА полимера“, „PCL полимери“, „Биоразградња PCL полимера“, „Компостирање“ и „Компостирање РНА и PCL материјала“. У одељку „Извори и биолошка улога липаза“ описане су основне одлике ових ензима, широко распрострањених код различитих врста, као и њихова заједничка биолошка улога – разградња масти. Одељак „Структура липаза и механизам ензимске катализе“ истиче присуство карактеристичног α/β хидролазног мотива код свих липаза, као и високо очуване каталитичке тријаде у оквиру активног места ензима. Детаљно је описан каталитички механизам ензима и интеракција са супстратом. Одељак „Бактеријске липазе“ описује липазе пореклом из бактерија и истиче да је експресија гена који кодирају ове ензиме код бактерија углавном регулисана срединским факторима и представља ћелијски одговор на недостатак нутријената. У одељку „Механизми секреције бактеријских липаза“ описани су комплексни начини секреције ванћелијских липаза у спољашњу средину. У одељку „Биохемијска карактеризација липаза“ дат је преглед температурних и рН оптимума липаза код различитих врста. Истакнута је висока термостабилност ових ензима, као и отпорност на органске раствараче. „Селективност липаза“ је одељак који класификује липазе на основу њихове селективности у избору супстрата, региоселективности и енантиселективности, на чему је заснована примена ових ензима. Одељак „Значај ензима липаза у биотехнологији и биоремедијацији“ даје осврт на изузетне карактеристике липаза због којих се ови ензими широко употребљавају у различитим

индустријским процесима и биоремедијацији вода и земљишта. Одељак „Примена липаза у биоразградњи полимера“ детаљно описује физичка и хемијска својства биоразградивих полимерних материјала од којих зависи процес ензимске разградње. Описани су механизми ензимске разградње полихидроксиалканоата (РНА) и поликапролактона (PCL), са акцентом на ензиме липазе. У одељцима који се тичу компостирања истакнуто је да је овај процес једно од најефикаснијих решења за уклањање биоразградивог отпада и дати су примери убрзане разградње полимера под дејством бактеријских ензима.

У поглављу **Циљеви** јасно је дефинисан главни научни циљ докторске дисертације да се идентификују и рекомбинантно експримирају нови бактеријски ензими лаказе и липазе из сојева рода *Pseudomonas* и анализира њихов потенцијал за примену у биоремедијацији загађених земљишта и вода. Кроз постављене специфичне циљеве у оквиру одељка који се тиче ензима лаказа, планиран је одабир сојева рода *Pseudomonas* који показују лаказну активност из колекције Лабораторије за молекуларну генетику и екологију микроорганизама (Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду), умножавање гена који кодирају ове ензиме, клонирање, оптимизација рекомбинантне експресије у хетерологом домаћину, пречишћавање и карактеризација рекомбинантних ензима и испитивање њиховог апликативног потенцијала у разградњи индустријских загађивача. У одељку који се тиче липаза постављени су специфични циљеви за одабир сојева са липолитичком активношћу, испитивање апликативног потенцијала одабраних сојева за разградњу природних и синтетичких полимерних материјала у пуферу и у компосту, умножавање гена који су потенцијално одговорни за ову активност, клонирање и оптимизација рекомбинантне експресије у хомологом домаћину.

У поглављу **Материјал и методе** описане су савремене методе микробиологије, молекуларне генетике, биохемије и биоинформатике коришћене у реализацији постављених циљева. Ово поглавље чини 8 потпоглавља у оквиру којих се налази 29 одељака и 14 пододељака. Наведени су бактеријски сојеви, комерцијални и конструисани вектори, реагенси и медијуми за култивацију бактерија (у присуству или одсуству одговарајућих антибиотика), као и услови њиховог гајења (температура, аерација). Детаљно су описане молекуларно биолошке методе коришћене у овој тези – изолација укупне и плазмидне ДНК, умножавање ДНК фрагмената методом ланчане реакције полимеразе (PCR), агарозна гел електрофореза, затим лигација ДНК фрагмената, припрема и трансформација компетентних ћелија, рестрикциона анализа плаزمида, као и секвенцирање ДНК. У оквиру потпоглавља „Биоинформатички алати“ описана је метода *in silico* анализе познатих секвенци гена за лаказе и липазе код сојева рода *Pseudomonas*, као и анализа секвенце генома *P. putida* F6. Детаљно је описан поступак дизајнирања прајмера за умножавање гена за лаказе и липазе, али и статистичка анализа и обрада података. Након тога, представљене су биохемијске методе за изолацију, концентровање, одређивање концентрације протеина, талочење и одсољавање протеина, као и метода за њихово раздвајање полиакриламидном гел електрофорезом (нативном и денатуришућом). Описане су и хроматографске методе за изолацију и пречишћавање протеина из дивљег соја *P. putida* F6 и рекомбинантних домаћина, као и N-терминално секвенцирање

протеинске фракције из дивљег соја *P. putida* F6. Следи опис метода за испитивање ензимске активности лаказа и липаза у тестовима са различитим супстратима. У оквиру последњег потпоглавља описане су методе за припрему полимера полихидроксиалканоата и поликапролактона, као и методе за утврђивање ензимске разградње ових полимера у саставу чврстих подлога, у пуферу и у моделу компоста – светлосна микроскопија и FTIR анализа.

У поглављу **Резултати** изложени су резултати истраживања који су груписани у две целине. У првом делу претражено је седам сојева рода *Pseudomonas* из лабораторијске колекције и детектована оксидативна активност карактеристична за лаказе код три соја – *P. putida* F6, *P. putida* KT2440 и *P. putida* CA-3. Сој који се највише истакао је *P. putida* F6 који је показао врло значајне разлике у лаказној активности у односу на друге сојеве. На основу постојећих секвенци за лаказе у сојевима рода *Pseudomonas* у доступним базама података дизајнирани су изрођени прајмери. Сојеви су анализирани реакцијом ланчане полимеразе на присуство гена који кодирају ове ензиме. Умножени су фрагменти одговарајуће величине код сојева *P. putida* KT2440 и *P. putida* CA-3, за које је методом секвенцирања и анализом секвенци утврђено преклапање са секвенцама гена за које се претпоставља да кодирају мулти-бакар оксидазе, односно лаказе. Направљени су и специфични прајмери за умножавање ових гена са додатим рестрикционим местима за потребе клонирања у експресиони pRSET B вектор. Умножени гени из сојева *P. putida* KT2440 и *P. putida* CA-3 за које се претпоставља да кодирају лаказе су означени као *mcoKT* и *mcoCA3*. Код осталих сојева није утврђено присуство ових гена. С обзиром да је сој *P. putida* F6 показао најзначајнију ензимску активност, приступило се пречишћавању протеина са активношћу лаказе методом јоноизмењивачке хроматографије. Протеин молекулске масе ~24 kDa који је пречишћен на колони са јаким анјонским измењивачем Q сефарозом, а након тога на гел филтрационој колони, означен је као Ласс1 и секвенциран на аминок крају. Друга, нехомогена протеинска фракција, означена као Ласс2 изгубила је већину лаказне активности након пречишћавања на гел филтрационој колони, те није коришћена у даљем раду. Редослед од седам аминокиселина на N-терминалном делу Ласс1 протеина био је следећи: МТННSЕD. Упоредо је урађено секвенцирање генома дивљег соја *P. putida* F6 и биоинформатичка анализа целокупне секвенце. Након анализе секвенце генома уочено је осам гена који потенцијално кодирају ензиме са активношћу лаказе, од којих је један, означен као *cbp*, садржао секвенцу која се преводи у аминокиселински низ МТННSЕD. Ген *copA* који потенцијално кодира за мулти-бакар оксидазу и који по величини одговара једном од протеина из нехомогене фракције Ласс2, одабран је заједно са *cbp* геном за умножавање, клонирање и рекомбинантну експресију. По секвенцама ових гена направљени су специфични прајмери и гени су умножени у реакцији ланчане полимеразе. Гени су клонирани су у експресиони вектор pRSET B и рекомбинантно експримирани у *Escherichia coli* домаћину. Секвенцирањем је утврђена идентичност са оригиналним секвенцама ових гена из генома *P. putida* F6, *P. putida* KT2440, *P. putida* CA-3, те су оне сачуване у GenBank бази података под приступним бројевима: MN075139 (*mcoKT*), MN075140 (*mcoCA3*), MN075141 (*cbp*) и MN075142 (*copA*). Поравнањем аминокиселинских секвенци МсоKT и МсоCA3 протеина добијена је сличност од 98 %. Биоинформатичком анализом аминокиселинских секвенци CopA, McoKT и

МсоСАЗ протеина утврђено је присуство домена карактеристичних за мулти-бакар оксидазе, док је код Свр протеина пронађен бакар-везујући домен. Рекомбинантно експримирани ензими показали су активност карактеристичну за лаказе, те су пречишћени и окарактерисани. Утврђено је да су сва четири ензима активна у широком опсегу рН и температура, као и да су термостабилни. Установљено је да је оптимална рН вредност за њихову активност рН 4, а оптимални температурни опсег од 30 °С до 50 °С. Испитивањем ензимске разградње тесктилних боја рекомбинантно експримираним лаказама уз додатак медијатора утврђен је веома добар потенцијал ћелијских екстраката који садрже ове ензиме да разграде боје које су широкој употреби у текстилној индустрији и индустрији боја: амидо црну 10Б, бромкрезол љубичасту, Еванс плаву, реактивну црну 5 и ремазол брилијант плаву. Најбоље резултате показао је ћелијски екстракт са рекомбинантним ензимом СорА који је разградио пет од седам тестираних боја.

У другом делу истраживања претражено је седам сојева рода *Pseudomonas* из лабораторијске колекције и детектована липолитичка активност код два соја – *P. aeruginosa* РАО1 и *P. chlororaphis* В-561. Приступило се испитавању ензимске разградње полимера полихидроксиалканоата и поликапролактона. Као индукер липолитичке активности сојева *P. aeruginosa* РАО1 и *P. chlororaphis* В-561 коришћено је маслиново уље. Показано је да ћелијски протеини оба соја разграђују ове полимере, као и да је уље добар индукер липолитичке активности. Такође је испитана разградња полимера у облику филма инкубацијом са ћелијским протеинима сојева *P. aeruginosa* РАО1 и *P. chlororaphis* В-561 у трајању од четири недеље, и у модел систему компоста са бактеријском културом непатогеног соја *P. chlororaphis* В-561 у трајању од четири недеље за поликапролактон и осам недеља за полихидроксиалканоате. Мерењем губитка масе и методом светлосне микроскопије утврђено је да је дошло до смањења масе полимера, као и додатне површинске ерозије у односу на контролне полимерне филмове. Биоинформатичком анализом издвојени су гени кандидати из сојева *P. aeruginosa* РАО1 и *P. chlororaphis* В-561 који претпостављено кодирају липолитичке ензиме. На основу секвенци ових гена направљени су прајмери за њихово умножавање. Умножени су гени за липазу А (*lipA*) и фосфолипазу Ц (*plcB*) из *P. aeruginosa* РАО1 соја, као и липазу А (*lipA*) из соја *P. chlororaphis* В-561, што је и потврђено секвенцирањем. Хомолога експресија у *P. putida* КТ2440 домаћину дала је три активна ензима, али је изостала њихова секреција у спољашњу средину.

Поглавље **Дискусија** посвећено је упоредној анализи резултата добијених у овој дисертацији и података документованих у досадашњој научној литератури. У овом поглављу истакнут је значај и допринос постигнутих резултата како у области фундаменталне молекуларне микробиологије, тако и у области примењене микробиологије.

У првом делу дискусије који се тиче ензима лаказа истакнуто је да је у новијој литератури описана примена неколико рекомбинантних бактеријских лаказа, углавном у процесима биоремедијације – разградњи синтетичких боја и уклањању полицикличних ароматичних угљоводоника, али и у биотрансформацији једињења која се користе у фармацеутској индустрији. Такође је наглашено да су описане лаказе из врста рода

Pseudomonas углавном идентификоване и пречишћаване из дивљих сојева и да је до сада једини рекомбинантно експримирани ензим *CopA* из соја *P. putida* КТ2440. Наведено је да је саставни део ове студије била потрага за новим, ефикаснијим бактеријским лаказама у сојевима рода *Pseudomonas* и рекомбинантна хетеролога експресија у домаћину једноставном за манипулацију као што је *E. coli*. У првом потпоглављу истакнуто је да је лаказна активност у ћелијским екстрактима сојева *P. putida* F6, *P. putida* КТ2440 и *P. putida* СА-3 указала на унутарћелијску локализацију ензима лаказа и да је ова чињеница у складу са подацима у литератури. Такође, наглашено је да је поређењем нуклеотидних и аминокиселинских секвенци гена за мулти-бакар оксидазе код сојева *P. putida* КТ2440 и *P. putida* СА-3 са генима који се могу пронаћи у доступним базама података и литератури установљено да се не ради о истим генима, и да су они по први пут умножени из тих сојева у овој студији. Истакнуто је и да је поравнањем аминокиселинских секвенци МсоКТ и МсоСА3 протеина утврђено да се ради о врло сродним мулти-бакар оксидазама са доменом карактеристичним за ове ензиме, присутним на истим позицијама. У другом потпоглављу наглашено је да се аминокиселински низ МТННSЕD на аминокиселинском делу протеина са лаказном активношћу пречишћеног из соја *P. putida* F6 није могао пронаћи међу лаказама доступним у базама података. Такође се наводи да су два гена – ген који за који се претпоставља да кодира протеин који садржи језгро са четири α -завојнице и везује бакар (*cbp* ген), као и ген за који се претпоставља да кодира мулти-бакар оксидазу (*copA* ген) из соја *P. putida* F6 по први пут у овом раду умножени, клонирани и рекомбинантно експримирани у хетерологом домаћину *E. coli*. Истакнуто је да су протеини *CopA* из соја *P. putida* F6 и протеин под истим називом из соја *P. putida* КТ2440 различити, са сличношћу аминокиселинских секвенци од 67,7 %. Такође, лаказа која је по литературним подацима пречишћена из соја *P. putida* F6 молекулске масе 59 kDa, разликује се од ензима идентификованих у овој студији – *Cbp* (~12,7 kDa) и *CopA* (~68,5 kDa). Такође је наведено да постоји неслагање у молекулској маси протеина из *Lacc1* фракције који је секвенциран (~24 kDa) и производа идентификованог *cbp* гена (~12,7 kDa). Истакнуто је да се иза *cbp* гена на растојању од само 11 базних парова налази *copC* ген, који потенцијално кодира периплазматични везивни протеин који регулише хомеостазу бакра, молекулске масе ~13,9 kDa, па је непосредна близина могући узрок потенцијалног преписивања ових гена у јединствени пептид, што може да разјасни неподударање претпостављених величина *Cbp* протеина и протеина из *Lacc1* фракције. Наглашено је да је активност четири рекомбинантно експримирана ензима увећана ~2,5 пута додавањем извора јона бакра у реакцију оксидације супстрата и да је ова чињеница у складу са литературним подацима. Такође, дат је и упоредни преглед температурних и рН оптимума, као и својства термотолеранције лаказа експримираних у овом раду и лаказа које су описане у литератури. Наведено је да ензими експримирани у овом раду поседују својства која су пожељна за примену у индустрији. Истакнуто је да су рекомбинантно експримиране лаказе из сојева рода *P. putida* F6, *P. putida* КТ2440 и *P. putida* СА-3 испитане у овом раду показале добар потенцијал за разградњу текстилних боја, узимајући у обзир да су у анализи коришћени ћелијски екстракти, а не пречишћени ензими. Наглашено је и да је употреба

медијатора за лаказе значајно допринела процесу разградње реактивних боје које имају виши редокс потенцијал у односу на ензим.

У другом делу дискусије дат је осврт на дејство липолитичких ензима сојева *P. aeruginosa* PAO1 и *P. chlororaphis* B-561 на разградњу полимера растворених у чврстим подлогама, као и полимера у облику филма у пуферу. Ови резултати поткрепљени су литературним подацима. Истакнуто је да је активност ензима који су разградили полихидроксиалканоате и поликапролактон детектована у ванћелијској и унутарћелијској фракцији протеина код оба соја који су гајени на маслиновом уљу као једином извору угљеника, те је претпостављено да су ензими који разграђују ове полимере двојаког порекла. Као последица дејства ензима утврђена је површинска ерозија код оба полимерна материјала у облику филма, као и умерен губитак масе. Код поликапролактона није уочена промена карбонилног индекса и индекса кристалинитета након четири недеље дејства ензима и овај резултат оправдан је високим нивоом кристалне уређености полазног материјала. Код полихидроксиалканоата није било могуће измерити ове индексе због аморфне природе полимера. Испитано је дејство липолитичких ензима непатогеног соја *P. chlororaphis* B-561 на полимерне филмове полихидроксиалканоата и поликапролактона у дизајнираном модел систему компоста. Након четири недеље третмана поликапролактона бактеријском културом соја *P. chlororaphis* B-561 у компосту промене су биле видљиве голим оком, а оптичком микроскопијом детектована је комплетна измена у површинској морфологији полимера, што заједно са релативно високим губитком масе и непромењеним карбонилним и индексом кристалинитета сугерише да се одвијала прогресивна, истовремена разградња аморфних и кристалних региона полимера. На основу губитка масе и посматрања микрографија површине полихидроксиалканоата јасно је уочено да је биоразградња полихидроксиалканоата средњег ланца убрзана дејством липолитичких ензима соја *P. chlororaphis* B-561 у року од осам недеља.

Како је у овој студији показан потенцијал липолитичких ензима из сојева *P. aeruginosa* PAO1 и *P. chlororaphis* B-561 за будућу примену у биоразградњи полимерних материјала, *in silico* анализом идентификована су три гена кандидата који потенцијално кодирају ове ванћелијске ензиме. Умножени гени који кодирају липазу А и фосфолипазу Ц из соја *P. aeruginosa* PAO1, као и липазу А из *P. chlororaphis* B-561, клонирани су и хомолого експримирани у *P. putida* KT2440 домаћину. Липолитичким есејем потврђена је активност рекомбинантних ензима, те је констатовано да су уклонирани гени функционални. Међутим, већи део липолитичке активности детектован је у унутарћелијским фракцијама рекомбинантних сојева, док је код дивљих сојева активност детектована у ванћелијским фракцијама, што је указало на чињеницу да није дошло до секреције рекомбинантних ензима у ванћелијску средину. Претпостављено је да је ова појава последица сложеног система секреције присутног код дивљих сојева. Наведено је да је *P. putida* KT2440 хомологи домаћин послужио за испитивање функционалности уклонираних гена и активности рекомбинантних ензима и да је остављен простор за накнадну оптимизацију процеса њихове секреције у спољашњу средину ради потенцијалне употребе ових ензима у биокатализи и биоразградњи полимерних материјала.

У поглављу **Закључци**, које је подељено на два пододељка, сажето и јасно су изнети најважнији закључци који су проистекли из анализе резултата добијених у оквиру докторске дисертације. Првој групи закључака припадају они који се односе на ензиме лаказе. Претраживањем колекције сојева рода *Pseudomonas* Лабораторије за молекуларну генетику и екологију микроорганизама, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, на присуство ензима лаказа детектована је ензимска активност код три од седам тестираних сојева. Умножени су гени који кодирају нове мулти-бакар оксидазе у сојевима *P. putida* КТ2440 и *P. putida* СА-3 – *mcoKT* и *mcoCA3*. Сличност аминокиселинских секвенци ова два протеина износи 98 %, па је закључено да се ради о сродним протеинима код ова два соја. Након биоинформатичке анализе N-терминалне секвенце пречишћеног протеина и целокупне геномске секвенце соја *P. putida* F6 умножена су два гена – *cbp* и *copA*, који немају никакве сличности са генима *mcoKT* и *mcoCA3*, па је сходно томе закључено да се ради о другом типу лаказа. Рекомбинантном експресијом у хетерологом *E. coli* домаћину добијена су четири функционална ензима високе термостабилности, са активношћу у широком рН и температурном опсегу и значајно увећаном активношћу у присуству јона бакра, те је закључено да је ово адекватан домаћин за њихову рекомбинантну производњу. Ћелијски екстракти са рекомбинантним ензимима су у присуству медијатора показали добар потенцијал за разградњу постојаних боја које се користе у текстилној индустрији, а најзначајнију активност показао је ћелијски екстракт са *CopA* ензимом. Закључено је да су сојеви рода *Pseudomonas* добар извор ензима лаказа са потенцијалом за примену у биоремедијацији.

Друга група закључака односи се на ензиме липазе. Липолитичка активност, индукована маслиновим уљем детектована је код два соја рода *Pseudomonas* – *P. aeruginosa* PAO1 и *P. chlororaphis* B-561. Закључено је да су ови сојеви добар извор ензима липаза са потенцијалом за биоразградњу природног полимера полихидроксиалканоата средњег ланца и синтетичког полимера поликапролактона јер је показано да могу изазвати разградњу ових полимера у оквиру чврстих подлога и у пуферу. Такође је показано да сој *P. chlororaphis* B-561 може убрзати разградњу ових полимерних материјала у модел систему компоста. Умножени су гени који кодирају ванћелијске липолитичке ензиме *lipA* и *plcB* из соја *P. aeruginosa* PAO1, као и *lipA* из *P. chlororaphis* B-561. Хомологом експресијом у *P. putida* КТ2440 домаћину и испитивањем активности липаза закључено је да је изостала адекватна секреција рекомбинантних ензима и да је за њихову примену у биокатализи и биоремедијацији неопходна оптимизација овог процеса.

У поглављу **Литература** представљена је листа коју чине 363 извора литературе који су омогућили развој идеје за извођење овог истраживања, као и објашњење добијених резултата и доношење закључака. Наведени извори су адекватни и покривају све појединачне области овог истраживања. Навођења литературе у самом тексту дисертације су јасна и примерена, како по садржају тако и по месту.

У поглављу **Прилози** представљено је пет прилога у оквиру којих су детаљно наведени табеларни прикази и слике одговарајућих резултата добијених у оквиру овог истраживања.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Из ове дисертације проистекла су два рада у часописима међународног значаја, као и једно саопштење на скупу међународног значаја.

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Mandic, M.**, Spasic, J., Ponjavic, M., Nikolic, M., Cosovic, V., O'Connor, K., Nikodinovic-Runic, J., Djokic, L., Jeremic, S. (2019). Biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) using whole cells and cell free protein preparations of *Pseudomonas* and *Streptomyces* strains grown on waste cooking oil. *Polymer Degradation and Stability*. 162: 160-168. (M21)
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.02.012>
2. **Mandic, M.**, Djokic, L., Nikolavits, E., Prodanovic, R., O'Connor, K., Jeremic, S., Topakas, E., Nikodinovic-Runic, J. (2019). Identification and Characterization of New Laccase Biocatalysts from *Pseudomonas* Species Suitable for Degradation of Synthetic Textile Dyes. *Catalysts*. 9(7): 629. (M22)
<https://doi.org/10.3390/catal9070629>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Mandic, M.**, Radivojevic, J., Djokic, L., Nikodinovic-Runic J., O'Connor, K., Vasiljevic, B., Jeremic, S. (2015). Towards biotechnological application of *Pseudomonas* spp. lipases, 6th Congress of European Microbiologists, FEMS, 7. – 11. Jun, 2015., Maastricht, Holandija, p. 2166 - 2166, (M34)

Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације кандидаткиње **Мине М. Мандић**, утврђен је индекс сличности од 11%. Увидом у извештај утврђено је да су подударана углавном последица цитата, употребе општих појмова, личних имена и библиографских података о коришћеној литератури, као и претходно објављених резултата истраживања проистеклих из докторандове дисертације. Додатно, одређени делови текста код којих је утврђено подударане нису повезани и немају смисао. Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Мине М. Мандић**, под насловом „**Биотехнолошки значајни ензими из сојева рода *Pseudomonas*: Идентификација и рекомбинантна експресија лаказа и липаза**“ те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Анализа докторске дисертације Мине М. Мандић под насловом „**Биотехнолошки значајни ензими из сојева рода *Pseudomonas*: Идентификација и рекомбинантна експресија лаказа и липаза**“ показује да је кандидаткиња успешно реализовала постављене циљеве кроз адекватно планиране истраживачке поступке. Докторска дисертација представља оригиналан научно-истраживачки рад који се бави рекомбинатном експресијом и карактеризацијом ензима лаказа и липаза у сојевима рода *Pseudomonas*, као и њиховом применом у биотехнологији и биоремедијацији. Резултати остварени у оквиру дисертације представљени су систематично и прегледно, а њихово критичко разматрање говори о добром познавању научне проблематике.

На основу увида у експериментални рад током истраживања и постигнуте резултате, Комисија закључује да су постављени задаци испуњени. Из дисертације су проистекла два научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата. Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Мине М. Мандић** и омогући кандидаткињи јавну одбрану рада.

У Београду, 20. 7. 2021. године

КОМИСИЈА:

др Сања Јеремић, виши научни сарадник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
Универзитет у Београду

др Јасмина Никодиновић-Рунић, научни саветник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
Универзитет у Београду

др Ђорђе Фира, редовни професор,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Горан Вукотић, научни сарадник,
Универзитет у Београду - Биолошки факултет