

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ

ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Саше Ватића, мастер хемичара

На редовној седници Наставно – научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној дана 11.03.2021. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Саше Ватића, мастер хемичара, докторанта Хемијског факултета, асистента Медицинског факултета, Универзитета у Београду, под називом:

„Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност пептидаза“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на својој седници одржаној дана 25.03.2021. године на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под редним бројем 61206-1216/2-21. Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научног већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Саше Ватића написана је на 94 стране, А4 формата, фонт 12, проред 1 и садржи 32 слика (од тога 6 у прилогу) и 11 табела. Докторска дисертација је подељена на 9 поглавља: Увод (2 стране), Теоријски део (28 страна), Циљеви (1 страна), Материјал и методе (12 страна), Резултати (13 страна), Дискусија (8 страна), Закључак (1 страна), Литература (26 страна, 338 цитата), Прилози (3 стране). Насловне стране дисертације су на српском и енглеском језику, као и сажетак (по 1 страна). Дисертација садржи и страну са именима чланова комисије, Захвалницу, Листу скраћеница (по 1 страна), Садржај (2 стране), кратку Биографију кандидата (1 страна), Изјаве о ауторству, истоветности (по 1 страна) и коришћењу (2 стране).

Увод садржи предмет истраживања дисертације са освртом на актуелност теме у научној литератури. Истакнута је повезаност структуре и активности пептидаза, као и важност

дефинисања формулација раствора који садрже пептидазе у погледу пуферских система, нејонских сурфактаната и складиштења на сниженим температурама. Важан аспект истраживања чини подобност коришћења дефинисаних формулација на побољшање постојећих биохемијских и микробиолошких протокола базираних на употреби пептидаза.

Теоријски део састоји се од пет целина у којима је кандидат увео **Проблем увијања протеина**, са акцентом на интермедијерно стање стопљене глобуле, у контексту **Стабилности протеина у раствору** зависно од космотропских и хаотропских чинилаца раствора и чувања на сниженим температурама. Дат је преглед структуре и функције **Модел пептидаза** и **Спектроскопских техника за праћење конформације протеина** коришћених у експерименталном раду. Такође је дефинисан **Проблем детекције *Listeria monocytogenes* у ферментисаним месним производима**, са прегледом литературе и уведен је простор за унапређење тренутно активних протокола за детекцију патогене бактерије.

Циљеви дисертације дефинисани су у истоименом поглављу.

Материјал и методе садрже опис реагенаса и метода које су коришћене током експерименталног рада ове дисертације.

Резултати су организовани према току кључних експеримената. Најпре су дефинисани оптимални пуферски системи за растворе трипсина у погледу одржања активности, структуре и додатих нејонских сурфактаната са минималним ефектима на аутолизу и денатурацију пептидазе на ниским температурама. Затим су окарактерисане активност, стабилност и супстратна специфичност папаина и пептидаза латекса смокве у одабраним пуферским системима и са додатком нејонских сурфактаната. Одабране оптималне формулације пептидаза коришћене су за побољшање микробиолошких протокола за детекцију бактеријског патогена *L. monocytogenes*.

Дискусија коментарише резултате дисертације упоредном анализом са научном литературом која се бави сличном проблематиком.

Закључак сумира најважније резултате и одговара на дефинисане циљеве.

Литература (338 цитата) обухвата научне радове, књиге и друге релевантне изворе са информацијама из области истраживања ове дисертације према редоследу појављивања.

Прилози садрже резултате експеримената који допуњују резултате.

Б. Кратак приказ резултата

У оквиру ове докторске дисертације дефинисани су оптимални услови за формулацију пептидаза у присуству нејонских сурфактаната при чему се задржава њихова активност и структурно уређење. Развијене пептидазне формулације су коришћене за унапређење постојећих биохемијских и микробиолошких поступака у којима се иницијално користе.

Комерцијални трипсин панкреаса говечета, као пептидаза широке примене, одабрана је као модел систем. Методама флуоресцентне спектроскопије и инфрацрвене спектроскопије са *Fourier*-овом трансформацијом (енг. скраћеница FTIR) испитан је структурни интегритет трипсина, а класичним ензимским есејима праћена је његова активност. За испитивање утицаја различитих одабраних пуферских система на активност пептидазе одабрани су фосфатни и бикарбонатни пуфери са јонима натријума, калијума или амонијума. Након дефинисања састава и моларности пуферских система у којима је активност трипсина након седам циклуса замрзавања/одмрзавања била виша од 90%, а структурни интегритет задржан, испитан је утицај нејонских сурфактаната на активност и структурну уређеност трипсина. Идентификован је и окарактерисан стабилни интермедијер развијања протеина (стопљена глобула), као и могући механизам којим се може пружити увид у повезаност одржања каталитичке активности одабраног ензима са његовим конформационим променама. Показано је да сурфактанти Tween 20 и 80 незнатно утичу на уређење трипсина након седам циклуса замрзавања/одмрзавања, док су код Triton X-100 сурфактанта примећене знате разлике које се огледају у променама трака Амидног I региона FTIR спектра карактеристичних за α -хеликс и очување трака карактеристичних за β -плочице. Утицај Triton X-100 сурфактанта на структуру протеина се може видети и у повећању доступности супстрата, модел протеина албумина говеђег серума, доприносећи значајном повећању хидролизе албумина трипсином и након седам циклуса замрзавања/одмрзавања. Утицај нејонских сурфактаната на аутолизу трипсина је такође одређен при чему након седам циклуса замрзавања/одмрзавања није било значајних разлика у његовој активности.

Папаин је екстрахован из комерцијалног препарата. Латекс смокве је сакупљен засецањем плодова и листова смокве (*Ficus carica* 'Brown Turkey') и пептидазе латекса смокве су изоловане комбинацијом таложних и хроматографских метода. Извршена је карактеризација њихове супстратне специфичности и утврђена је казеинолитичка и желатинолитичка активност, при чему су пептидазе латекса смокве показале већу активност ка општем протеолитичком супстрату казеину у поређењу са папаином. Комбинацијом експеримената инхибиције специфичним инхибиторима, класичних и дводимензионалних електрофоретских техника, указано је да су ензими изоловани из латекса смокве меша

серинских и цистеинских пептидаза док је папаин искључиво цистеинска пептидаза. Упоредном анализом Амидних I-III трака нативне структуре колагена и колагена хидролизованог папаином или пептидазама латекса смокве добијен је увид у ефекте различитих пептидаза. Како је до потпуне хидролизе троструког хеликса колагена долазило само у случају пептидаза латекса смокве, закључено је да смеша садржи серинске пептидазе – колагеназе које су одговорне за његову потпуну хидролизу. Структурна стабилност папаина и пептидаза латекса смокве у присуству нејонских сурфактаната потврђена је FTIR спектроскопијом будући да у погледу присуства и садржаја трака придружених секундарним структурама протеина нису примећене значајне промене.

Пептидазне формулације трипсина, папаина и пептидаза латекса смокве у дефинисаним калијум-фосфатним пуферским системима са додатком нејонских сурфактаната коришћене су за побољшање протокола за детекцију *L. monocytogenes* патогених бактерија присутних у ферментисаним производима од меса. Синергистички ефекти формулација трипсина са нејонским сурфактантима које су замрзаване/одмрзаване у седам циклуса у комбинацији са класичном *stomacher* методом разградње производа од меса који су садржали *L. monocytogenes*, водио је повећању броја ћелија које формирају колоније (енг. скраћеница CFU) до 40%. Коришћењем исте методологије са додатком папаина или пептидаза латекса смокве у зависности од коришћених сурфактаната, број CFU је такође значајно повећан.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Феномен увијања протеина у активну тродимензионалну структуру је од кључне важности за функцију протеина и зависи од окружења у коме се налази при чему кључну улогу има вода [1]. Такође, указано је да на структуру, а самим тим и активност протеина утичу сви остали чиниоци раствора тако што стабилизују структуру протеина – космотропи или на њу негативно утичу – хаотропи [2]. Како је биохемијска, биотехнолошка и медицинска употреба сурфактаната постала незаобилазна тачка великог броја протокола, њихов утицај на стабилност и активност протеина је изузетно активна област истраживања. Један од важних чинилаца је и стабилност протеина на сниженим температурама у контексту формулације раствора [3], при чему нејонски сурфактанти исказују не само космотропски, већ и криопротективни ефекат [4]. Изазови избора методологије за праћење стабилности одабраних модел пептидаза, превазиђени су екстензивном употребом FTIR и флуоресцентне спектроскопије [5].

У овој студији потврђен је тренд стабилизујућег ефекта *Hofmeister*-ове серије за пуферске системе [2], који су затим коришћени у комбинацији са нејонским сурфактантима водили компаративном побољшању одржања структуре и активности пептидаза на сниженим температурама. Детектовани су метастабилни интермедијери (стопљене глобуле) који поседују структуру која је јако блиска нативној што је у складу са ранијим подацима добијених методама флуоресцентне спектроскопије [6]. За папаин и пептидазе латекса смокве, окарактерисане су желатинолитичка, односно колагенолитичка и шира пептидазна специфичност као и стабилност и активност у присуству нејонских сурфактаната чиме су потврђене раније студије [5,7]. Компаративно, нејонски сурфактанти Tween 20 и 80 су доприносили побољшању очувања структуре свих пептидаза без утицаја на активност, док је Triton X-100, иако делимично негативно утицао на структуру пептидаза, водио побољшању детектоване активности на глобуларне протеине специфично на албумин говеђег серума у складу са познатим студијама [8].

Резултати ове дисертације поред резултата који доприносе фундаменталном разумевању биохемијских концепата повезаности стабилности протеина и њихове активности у контексту различитих пуферских система, садржаја нејонских сурфактаната и снижене температуре, поседује и шири применљиви значај. Дефинисане формулације пептидаза са нејонским сурфактантима у концентрацијама које су до сто пута ниже од у поређењу са постојећим протоколима коришћене су за разградњу ферментисаних производа који су инокулирани бактеријским патогеном *L. monocytogenes* [9]. Коришћене концентрације су дефинисане како би се избегао негативан утицај пептидаза на вијабилност бактерија истовремено омогућавајући превазилажење проблема њихове адхезије [10].

Литература :

1. Y. Harano, M. Kinoshita, *Large gain in translational entropy of water is a major driving force in protein folding*. Chem Phys Lett, 2004. **399**(4–6): p. 342–348.

<https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2004.09.140>

2. X. Tadeo, B. López-Méndez, D. Castaño, T. Trigueros, and O. Millet, *Protein Stabilization and the Hofmeister Effect: The Role of Hydrophobic Solvation*. Biophys J, 2009. **97**(9): p. 2595-2603.

<https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2009.08.029>

3. B. Rašković, S. Vatić, B. Anđelković, V. Blagojević, and N. Polović, *Optimizing storage conditions to prevent cold denaturation of trypsin for sequencing and to prolong its shelf life*. Biochem Eng J, 2016. **105**(A): p. 168–176.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.018>

4. A. Hillgren, J. Lindgren, and M. Aldén, *Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH*. *Int J Pharm*, 2002. **237**(1–2): p. 57–69.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00021-2)
5. B. Rašković, M. Popović, S. Ostojić, B. Anđelković, V. Tešević, and N. Polović, *Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage*. *Spectrochim Acta A*, 2015. **150**: p. 238–246.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.05.061>
6. M. Brumano and M. Oliveira, *Urea-induced denaturation of beta-trypsin: an evidence for a molten globule state*. *Protein Pept Lett*, 2004. **11**(2): p. 133–140.
<https://doi.org/10.2174/0929866043478257>
7. K. Nishimura, K. Higashiya, N. Ueshima, T. Abe, K. Yasukawa, *Characterization of proteases activities in Ficus carica cultivars*. *J Food Sci*, 2020. **85**(3): p. 535–544.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15028>
8. S. K. Singh, N. Kishore, *Thermodynamic insights into the binding of triton X-100 to globular proteins: A calorimetric and spectroscopic investigation*. *J Phys Chem B*, 2006. **110**(19): p. 9728–9737. <https://doi.org/10.1021/JP0608426>
9. J. W. F. Law, N. S. Ab Mutalib, K. G. Chan, L. H. Lee, *An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of Listeria monocytogenes in food*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: 1227.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01227>
10. U. M. Rodrigues-Szulc, G. Ventoura, B. M. Mackey, M. J. Payne, *Rapid physicochemical detachment, separation and concentration of bacteria from beef surfaces*. *J Appl Bacteriol*, 1996. **80**(6): p. 673–681. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1996.TB03273.X>

Г. Научни радови објављени у међународним часописима и саопштења са скупова који су део докторске дисертације

Резултати истраживања ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада у часописима са SCI листе на којима је кандидат први аутор. Један рад је објављен у часопису категорије M21, а други рад је категорије M22. Такође, резултати су презентовани у облику једног саопштења на националном скупу.

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. Saša Vatić, Nemanja Mirković, Jelica R. Milošević, Branko Jovčić, Natalija Đ. Polović, *Broad range of substrate specificities in papain and fig latex enzymes preparations improve enumeration of Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, 2020. **334**: 108851.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108851>

IF₂₀₂₁ = 5,911

Поље истраживања: Microbiology (36/138, 2021)

ISSN: 0168-1605 (print), 1879-3460 (online)

Рад у истакнутом међународном часопису (M22)

1. Saša Vatić, Nemanja Mirković, Jelica R. Milošević, Branko Jovčić, Natalija Đ. Polović, *Trypsin activity and freeze-thaw stability in the presence of ions and non-ionic surfactants*. J Biosci Bioeng, 2021. **131**(3): p. 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.10.010>

IF₂₀₂₁ = 3,185

Поље истраживања: Biotechnology & Applied Microbiology (95/161, 2021)

ISSN: 1389-1723 (print), 1347-4421 (online)

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

1. Saša Vatić, Nemanja Mirković, Branko Jovčić, Natalija Polović, *The effect of buffer composition and nonionic surfactants on trypsin cold stability*. Serbian Biochemical Society Ninth Conference Proceedings, p. 178 - 179, Beograd, 14-16 November 2019. ISBN 978-86-7220-101-7.

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена дана 14. 06. 2023. на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018). Помоћу програма iThenticate, којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације утврђено је да количина подударања текста износи 8%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена/звања, библиографских података о коришћеној литератури, односно општих места и података, и претходно публикованих резултата истраживања докторанта, који

су проистекли из ове дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, Комисија сматра да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Ђ. Закључак

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације под насловом: „**Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност пептидаза**“ закључила да је кандидат Саша Ватић успешно одговорио на постављене циљеве ове дисертације, а који се односе на разумевање утицаја нејонских сурфактаната на структуру и активност одабраних пептидаза у складишним и оперативним условима.

Научно-истраживачки рад кандидата публикован је у оквиру 2 научна рада (1 категорије M21 и 1 категорије M22) проистекла из докторске дисертације. Поред тога, резултати проистекли из ове докторске дисертације саопштени су и на 1 научном скупу (M64).

Комисија сматра да резултати поднети у приложеној докторској дисертацији представљају значајан допринос у области биохемије, будући да доприносе разумевању двојаког утицаја нејонских сурфактаната на активност пептидаза – утицај на саму структуру пептидаза и утицај на доступност протеинских супстрата, укључујући и непожељну аутолитичку активност. Ова дисертација пружа искорак у успостављању оптималних услова и формулација пептидаза које омогућавају оптималну активност и специфичност према супстратима на ниским и на оперативним температурама у присуству нејонских сурфактаната. Описане формулације обухватају: оптимизацију састава пуферског система са оптималним концентрацијама нејонских сурфактаната за пептидазне ензиме у циљу очувања структуре и активности ензима током складиштења и употребе ензима на ниским и оперативним температурама, као и оптимизацију пептидазних формулација у погледу каталитичке активности и супстратне специфичности према природним протеинским супстратима. Пажња је посвећена карактеризацији структурних промена ензима, са посебним освртом на структуру и активност стопљене глобуле. Оптимизација пептидазних формулација је значајна у погледу примене истих за повећање осетљивости детекције патогена *L. monocytogenes* у микробиолошким тестовима ферментисаних прехранбених производа.

На основу свега изложеног Комисија предлаже Научно-наставном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Саше Ватића под насловом „Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност пептидаза“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд, 3.7.2023.

Комисија:

Проф. др Наталија Половић, редовни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Радивоје Продановић, редовни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Бранко Јовчић, редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Иванка Карацић, редовни професор
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Данијела Крстић, редовни професор
Медицински факултет, Универзитет у Београду
