

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
Владимир Вукић, дипл. биол. - мастер

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
1. Датум и орган који је именовao комисију 27.03.2015., Наставно–научно веће природно-математичког факултета у Новом Саду
2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: 1. Др Едвард Петри , доцент, Биохемија, 15.07.2013., Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет; 2. Др Спасенија Милановић , редовни професор, Технологије конзервисане хране, 04.05.2004., Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад; 3. Др Данијела Којић , доцент, Биохемија, 01.07.2010., Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет; 4. Др Анђелка Ћелић , доцент, Биохемија, 15.07.2013., Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
1. Име, име једног родитеља, презиме: Владимир (Радован) Вукић
2. Датум рођења, општина, држава: 20.12.1982., Нови Сад, Република Србија
3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Природно-математички факултет, дипломирани биолог-мастер, дипломирани биолог-мастер
4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2008., доктор биолошких наука
5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: –
6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: –
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ: Предвиђање тродимензионалне структуре и карактеризација активног места одабраних бета-галактозидаза

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Докторска дисертација садржи шест поглавља:

1. Увод (стр. 1-3),
2. Општи део (стр. 3-82);
3. Материјал и методи (стр. 83-87);
4. Резултати и дискусија (стр. 87-119);
5. Закључци (стр. 119-121);
6. Литература (стр. 121-139).

Дисертација је написана на 138 страна, А4 формата, садржи 86 слика, 9 табела и 242 литературна навода. На почетку је дата кључна документација са изводом на српском и енглеском језику.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Увод указује на могућности и значајност молекуларног моделовања као и одређивања тродимензионалне структуре протеина. Истакнута је примена поменутих метода у биотехнологији и фармацеутској индустрији. Лактоза је представљена као доминантни шећер у млеку и указано је на њену улогу у млечној индустрији. Наведене су доминантне пробиотске стартер културе и указано на недостатак карактеризације њихових бета-галактозидаза. На крају увода дати су предмет и циљ истраживања у оквиру дисертације. Генерално посматрано може се констатовати да је у уводу јасно и концизно дефинисан циљ истраживања који не одступа од формулација датих у пријави докторске дисертације.

Општи део дисертације састоји се из девет потпоглавља у којима кандидат приказује досадашња релевантна научна сазнања везана за испитивану област. Свако потпоглавље заокружује једну целину. Описана је анализа секвенци протеина и представљене најзаступљеније методе и алгоритми за анализу. Детаљно су описане енергије у интрамолекулским везама које су релевантне за циљ дисертације. Досадашња истраживања структуре протеина представљена су темељно и поткрепљена релевантном литературом. Истакнут је значај хомолог молекуларног моделовања и *de novo* предвиђања структуре протеина, њихова примена, као и ограничења. Експериментално одређивање структуре протеина приказано је кроз опис фаза одређивања, као и досадашњим резултатима представљеним у базама података. Описане су методе предвиђања интеракција протеин лиганд и дат приказ најчешће примењиваних функција. Наведени су и најзаступљенији и најпоузданији рачунарски програми за ту намену. Дат је приказ различитих стартер култура које се користе за производњу ферментисаних млечних производа. Описани су транспорт и биохемијске трансформације угљених хидрата и њихова хидролиза. Структура, функција и регулација релевантних бета-галактозидаза је описана до детаља у складу са предметом и циљевима дисертације.

У поглављу **Материјал и методи рада** дат је приказ секвенци које су коришћене у дисертацији. Детаљно су описане методе коришћене за хомолог моделовање, кластер анализу, минимизацију енергије, као и симулације докинга. Такође, детаљно су описане и методе примењене у експерименталном раду коришћене за: анализу физичко-хемијског квалитета млека и ферментисаних млечних напитака (рН вредност, млечна маст, сува материја и пепео). За статистичку обраду експерименталних резултата коришћени су савремени софтверски програми, а резултати су обрађени на адекватан и валидан начин.

У поглављу **Резултати и дискусија** резултати истраживања груписани су у три одвојене али повезане целине и приказани су у шест потпоглавља. Редослед приказаних резултата прати ток спроведених испитивања. У првом експерименту урађена је кластер и филогенетска анализа бета-галактозидаза. На основу кластер анализе предвиђене су активне резидуе ензима. Затим су на основу хомологих секвенци конструисани и верификовани модели одабраних бета-галактозидаза. У ту сврху коришћени су најсавременији и најпогоднији доступни софтвери и методе. Добијени тродимензионални модели су описани и поређени са

хомологим структурама. Анализирана су активна места и сличности у структури и секвенцама између шаблона и моделованих ензима. Урађена је докинг симулација лактозе и галактозе у свим бета-галактозидазама: *S. Thermophilus*, *L. Acidophilus*, *B. animalis ssp. lactis*, *E. coli*, *Arthrobacter* sp., *K. lactis*, *B. circulans ssp. Alkalophilus* и *T. thermophilus-a*. Утврђене су аминокиселине које учествују у везивању супстрата за ензим и њихово везивање приказано је тродимензионално и шематски. Дискутоване су разлике међу моделованим ензимима као и шаблон секвенцама. У другом експерименту испитана је бета-галактозидаза *B. thetaiotaomicron-a*. Извршено је поравнање са хомологим секвенцама и утврђен степен сличности са њима. Након докинг симулације са лактозом и галактозом предвиђене су активне резидуе. У трећем експерименту испитана је кинетика разградње лактозе бета-галактозидазом *K. lactis-a*, додате у различитим концентрацијама, након 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минута. Резултати су приказани графички и дискутовани на одговарајући начин. У анализи и тумачењу добијених резултата кандидат је веома успешно поредио сопствене резултате са релевантним подацима из цитиране литературе.

У поглављу **Закључци**, на основу добијених резултата и дискусије закључци су јасно и концизно изведени, те се могу сматрати поузданим и научно заснованим и одговарају постављеном циљу дисертације.

Поглавље **Литература**, садржи списак 242 референци цитираних на уобичајен и правилан начин. Избор референци је актуелан и примерен тематици која је предмет ове дисертације.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Истраживања која су урађена у оквиру докторске дисертације, верификована су у следећим радовима:

Рад штампан у часопису међународног значаја (категорија М23)

1. Вукић, В., Хрњез, Д., Милановић, С., Илићић, М., Канурић, К., Петри, Е. (у штампи): Comparative molecular modeling and docking analysis of β -galactosidase enzymes from commercially important starter cultures used in the dairy industry. *Food Biotechnology*.

Рад штампан у часопису националног значаја (категорија М52)

2. Илић Удовичић, Д., Милановић, С., Илићић, М., Мандић, А., Хрњез, Д., Вукић, В. (2013): The kinetics of lactose hydrolysis in milk permeate, *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, 24, 9-12.

Саопштење на међународном скупу штампано у целини (категорија М33)

3. Вукић, В., Хрњез, Д., Милановић, С., Илићић, М., Канурић, К., Петри, Е. (2014): Prediction of Active Residues of β -galactosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. 8th International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics (PACBB 2014). *Advances in Intelligent Systems and Computing* Volume 294, 2014, pp 65-71.
4. Вукић, В., Хрњез, Д., Милановић, С., Илићић, М., Канурић, К., Петри, Е. (2014): Prediction of structure and catalytic residues of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. II International Congress "Food Technology, Quality and Safety" (FoodTech), Novi Sad, 28-30.10.2014. *Proceedings*, pp 191-195.

Саопштење на међународном скупу штампано у изводу (категорија М34)

5. Вукић, В., Хрњез, Д., Милановић, С., Илићић, М., Канурић, К. (2013): Building of 3D structure model and annotation of bifidobacterial beta-galactosidase. Sixth Joint Sheffield Conference on Chemoinformics. 22-24th July 2013. Sheffield, UK. Book of Abstracts, 78-79.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- У овој дисертацији представљен је протокол за моделовање комерцијално важних бета-галактозидаза и анализирање њихових интеракција са лактозом као супстратом. Ови резултати треба да пруже оквир за молекуларна истраживања везивања и разградње лактозе, као и за будуће дизајнирање комерцијално интересантних бета-галактозидаза.
- На основу сличности анализиране секвенце се могу поделити у два кластера. Оваква подела је очекивана обзиром да чланови истих класера припадају истој субфамилији гликозид хидролаза. Чланови кластера 1 припадају GH-2 субфамилији, док чланови кластера 2 припадају GH-42 субфамилији. Поравнањем секвенци добијене су потенцијалне активне резидуе. На основу кластер анализе и поравнања секвенци каталитички активне резидуе бета-галактозидаза испитиваних сојева могле би бити GLU458/GLU546 код *S. thermophilus*-а, GLU148/GLU307 код *L. Acidophilus*-а и GLU164/GLU324 код *B. animalis* ssp. *lactis*-а.
- Претраживање BlastP програмом, показало је да бета-галактозидазе *S. thermophiles* имају висок степен сличности са 1DP0A (*Escherichia coli*), док бета-галактозидазе *L. acidophilus* и *B. animalis* ssp. *lactis* имају висок степен сличности са 3TTS A (*Bacillus circulans*). Узимајући у обзир филогенетску анализу (различити типови), BlastP резултати (висок степен хомологије између секвенци) указују на хоризонтални трансфер гена током еволуције *L. acidophilus*-а и *B. animalis lactis*-а.
- Конструисани су хомологи модели бета-галактозидаза *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *B. animalis* ssp. *lactis*. Мономер бета-галактозидазе *S. thermophilus*-а се састоји од 5 домена, од којих централни TIM барел домен има функционалну улогу у разградњи супстрата. Бета-галактозидазе *L. acidophilus*-а и *B. animalis* ssp. *lactis*-а имају сличну укупну структуру, што је очекивано обзиром да су конструисани применом исте шаблон структуре. Мономер бета-галактозидазе из *L. acidophilus*-а и *B. animalis* ssp. *lactis*-а се састоји из 3 домена са каталитичким TIM барел доменом.
- За проверу три моделована ензима (*S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *B. animalis* ssp. *lactis*) конструисани су Рамачандранови плотови. На основу Рамачандранових плотова може се закључити да моделоване бета-галактозидазе имају повољне углове веза, посебно у региону активног места што је од кључног значаја за њихову примену у даљим истраживањима. Моделовани ензими су даље валидовани структуралним суперпозиционирањем са њиховим шаблон структурама.
- Молекуларни докинг са бета-галактозидазама из *Arthrobacter* sp., *K. lactis*, *S. thermophilus*, *B. circulans* ssp. *alkalophilus*, *L. acidophilus*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *T. thermophiles* и *B. thetaiotaomicron* спроведен је са циљем да се испитају почетне фазе везивања лактозе. Из резултата симулације молекуларног докинга свих бета-галактозидаза види се да се супстрат веже за активно место које се налази у региону високе електронегативности. Овакви резултати су у складу са механизмом деловања TIM барел каталитичког домена где реакција започиње деловањем нуклеофила на везу разградње супстрата. Симулације докинга су потврдиле активна места предложена поравнањем секвенци и откриле резидуе које учествују у везивању лактозе и галактозе као супстрата.
- На основу сличности секвенци може се закључити да је нуклеофилна резидуа бета-галактозидазе *B. thetaiotaomicron*-а GLU259. Анализом конзервативних региона, као и докинг симулације, може се закључити да улогу протон донора у бета-галактозидази *B. thetaiotaomicron*-а има резидуа GLU182.
- Хемијски састав млека за испитивање активности бета-галактозидазе *Kluveromyces lactis*-а је у складу са Правилником о квалитету производа од млека и starter култура Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије. Целокупна лактоза се разградила у пермеату на температури од 40°C и при концентрацији ензима од 0,1% након 60 минута од тренутка додатка ензима. Максимална брзина се постиже у току првих 10 минута. Из добијених резултата се може закључити да бета-галактозидаза *K. lactis*-а има високу ефикасност приликом разградње лактозе што је чини погодном за комерцијалну употребу у индустрији млека.

- Резултати добијени у овој дисертацији могу имати велики апликативни значај у индустрији млека где се примењује ензим бета-галактозидаза за разградњу лактозе приликом производње делактозираног млека или других производа без лактозе.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Кандидат Владимир Вукић, дипл. биолог-мастер је у потпуности обавио истраживања која су била предвиђена планом у пријави ове дисертације. Добијени резултати су проистекли из оригинално постављених експеримената у циљу предвиђања тродимензионалне структуре одабраних бета-галактозидаза и карактеризације њихових активних места. Резултати истраживања су систематично и прегледно приказани, а дискусија заснована на добром познавању истраживане научне области и на најновијим научним сазнањима, те се начин приказа и тумачења резултата истраживања оцењује позитивно.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Дисертација садржи све битне елементе.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Дисертација представља оригиналан допринос науци, јер је први пут у научној литератури приказан тродимензионални изглед бета-галактозидаза, сојева *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*. Такође, по први пут испитана су њихова активна места, као и активно место бета-галактозидазе врсте *Bacteroides thetaiotaomicron* у интеракцији са супстратом и продуктом реакције. Приказане су резидуе које учествују у разградњи и везивању супстрата чије познавање је од изузетног значаја за разумевање процеса и потенцијалну манипулацију ензимом. Утврђена је и активност бета-галактозидазе врсте *Kluyveromyces lactis*-a.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Недостаци дисертације нису уочени.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:

Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију Владимира Вукића, дипл. биолог - мастер, под називом: Предвиђање тродимензионалне структуре и карактеризација активног места одабраних бета-галактозидаза и предлаже да се прихвати ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ, а кандидату одобри одбрана рада.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

др Спасенија Милановић, редовни професор
Технолошки факултет Нови Сад
Универзитет у Новом Саду

др Данијела Којић, доцент,
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

др Анђелка Ђелић, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

др Едвард Петри, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду