

**Наставно-научном већу  
Хемијског факултета  
Универзитета у Београду**

**Предмет:** Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације мастер хемичара Саше Ватића, асистента Медицинског факултета Универзитета у Београду

На редовној седници Научно-наставног већа Хемијског факултета одржаној 12. новембра 2020. године одређени смо у Комисију подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата Саше Ватића, мастер хемичара, предложене под насловом:

**„Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност протеаза“,**

На основу проучене документације подносимо Наставно-научном већу следећи

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **А. Биографски подаци о кандидату**

Саша Ватић рођен је 23. октобра 1988. године у Неготину, Република Србија. Средњу медицинску школу, смер фармацеутски техничар, завршио је у Пожаревцу. 2007. године уписао је основне академске студије на Хемијском факултету, Универзитета у Београду на студијском програм Хемија. Дипломирао је 2012. године са просечном оценом 8,74 и одбранио је завршни рад „Синтеза премошћених фулеропиролидина” оценом 10, под менторством др Драгане Милић, редовног професора. 2014. године завршио је мастер академске студије на Хемијском факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Хемија, са просечном оценом 9,75 одбранивши мастер рад „Оптимизација услова чувања трипсина за секвенцирање у циљу спречавања

његове денатурације на хладно” са оценом 10, под менторством др Наталије Половић, ванредног професора. 2014. године уписао је докторске академске студије на Хемијском факултету, Универзитета у Београду на студијском програму Биохемија под менторством др Наталије Половић, ванредног професора. Све испите предвиђене планом и програмом положио је са просечном оценом 10,00.

Током школске 2016/17. као гостујући докторски студент, боравио на Департману за фармацеутску хемију Универзитета и Бечу, где се бавио испитивањима у области неуропротеомске анализе старења мозга код пацова. Од 2018. године је асистент на Катедри за хемију Медицинског факултета, Универзитета у Београду. Активан је члан Биохемијског друштва Србије, Друштва за неуронауке Србије и Аустријске асоциације за протеомику и метаболомику.

## **Б. Објављени научни радови и саопштења**

Саша Ватић је први аутор два научна рада, од којих је један публикован у врхунском међународном часопису категорије M21, а други у истакнутом међународном часопису категорије M22. Коаутор је и на 2 научна рада публикована у врхунским међународном часопису категорије M21. Своје резултате презентовао је на две националне конференције са међународним учешћем.

### **Радови публиковани у врхунском међународном часопису (M21)**

1. **Vatić S.**, Mirković N., Milošević J., Jovčić B., Polović N., Broad range of substrate specificities in papain and fig latex enzymes preparations improve enumeration of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology* 2020, 334, 108851.

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

2. Vrhovac L., Šelemejevac S., **Vatić S.**, Mitrović A., Milošević J., Lolić A., Beletić A., Polović N., Novel approach to the measurement of antithyroglobulin antibodies in human serum –application of the Quartz Crystal Microbalance sensors, *Talanta* 2021, 223 (2), 121588. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121588>

3. Rašković B., **Vatić S.**, Anđelković B., Blagojević V., Polović N., Optimizing storage conditions to prevent cold denaturation of trypsin for sequencing and to prolong its shelf life, *Biochemical Engineering Journal* 2016, 105, 168–176.

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

### **Рад у изузетном међународном часопису (M22)**

1. **Vatić S.**, Mirković N., Milošević J., Jovčić B., Polović N, Trypsin activity and freeze-thaw stability in the presence of ions and non-ionic surfactants, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.10.010>

### **Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M64)**

1. **Vatić S.**, Mirković N., Jovčić B., Polović N., The effect of buffer composition and nonionic surfactants on trypsin cold stability, Ninth Conference of Serbian Biochemical Society, Belgrade, Serbia; 14 – 16. 11. 2019.; Book of Abstracts; pp. 178. ISBN 978-86-7220-101-7

2. **Vatić S.**, Rašković B., Polović N., Cold storage of trypsin in alkaline conditions prevent protein cold denaturation, Third Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia; 24. 10. 2015. Book of Abstracts; pp. 65. ISBN 978-86-7132-059-7

### **В. Образложење теме**

**1. Научна област:** Хемија

**Ужа научна област:** Биохемија

### **2. Предмет научног истраживања**

Предмет истраживања ове докторске дисертације је проучавање утицаја различитих формулација козмотропских пуферских система (јони: калијум, натријум, амонијум,

фосфат и бикарбонат) са нејонским сурфактантима (Tween 20, Tween 80 и Triton X-100) на структуру и активност протеаза на ниским температурама.

На групи модел протеаза (трипсин, папаин и хетерогена смеша протеазе латекса смокве) биће описан утицај козмотропских јона и сурфактаната на очување примарне структуре (утицај на аутолизу) и терцијарне структуре протеина (утицај на денатурацију) на ниским температурама.

Посебна пажња биће посвећена одређивању супстратних специфичности протеаза у оперативним условима у циљу евалуације могућности примене оптимизованих формулација за дисоцијацију ткива у микробиолошким тестовима хране.

### **3. Научни циљ истраживања**

У оквиру докторске дисертације биће дефинисани услови формулације протеазних ензима с обзиром на састав и концентрацију козмотропа у пуферима, као и присуство нејонских сурфактанта. Ови аспекти су од примарне важности за очување активности ензима на ниским температурама на којима се формулације складиште и/или се изводе ензимске реакције. Биће испитана стабилност примарне структуре протеаза (аутолитичка активност) и окарактерисане структурне промене настале услед дестабилизације нативне структуре ензима на ниским температурама, као и њихов утицај на коначну каталитичку активност ензима. Посебна пажња биће посвећена идентификацији и карактеризацији стабилних интермедијера развијања протеина (стопљених глобула), као и могућих механизма којима се може пружити увид у повезаност одржања каталитичке активности одабраних ензима са њиховим конформационим променама.

Секундарни аспект истраживања биће испитивање специфичности формулација према природним супстратима у циљу процене могућности коришћења добијених ензимских препарата за повећање осетљивости детекције и квантификације микроаеробних патогена поспешивањем дисоцијације ткива ферментисаних прехранбених производа.

#### 4. Методе истраживања

Евалуација утицаја различитих пуферских система који ће садржати нејонске сурфактанте као адитиве на очување структуре и активности протеаза на ниским температурама биће остварена употребом низа биохемијских техника.

У циљу изоловања и карактерисања нативних протеина биће коришћене стандардне методе препаративне биохемије (хроматографија, електрофореза, методе за квантификацију протеина, ензимски есеји са комерцијалним синтетичким супстратима (N $\alpha$ -бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилин-хлорид). Протеазе ће бити дестабилизоване у оперативним условима (+4°C) и применом вишеструких циклуса замрзавања и одмрзавања. Процена утицаја козмотропа и сурфактаната на стабилност примарне структуре биће процењена одређивањем аутолитичке активности. Утицај сурфактаната на активност нативних ензима преко повећања доступности супстрата биће испитана коришћењем неспецифичног протеолитичког супстрата (албумин серума говечета). Оптимизација протеолитичких формулација у погледу каталитичке активности и супстратне специфичности према природним протеинима (казеин, нерастворни колаген типа 1) биће одређена квантификацијом производа протеолизе у реакцији са нинхидрином и анализом промене структуре супстрата применом инфрацрвене спектроскопије са *Fourier*-овом трансформацијом.

Важан аспект представљаће карактеризација структурних промена самих ензима. Промене секундарних структура, изложености специфичних аминокиселинских остатака растварачу, као и склоности ка агрегацији ће бити праћене инфрацрвеном спектроскопијом са *Fourier*-овом трансформацијом. Утицај конформационих промена на нивоу целог протеина биће праћен одређивањем параметара изложености хидрофобних површина растварачу мерењем промена флуоресценције 8-анилинонафтален-1-сулфонске киселине (енг. скраћеница ANS) и праћењем промена флуоресценције остатака триптофана како би се пружио увид у механизам настајања стабилних интермедијера денатурације протеина (стопљених глобула).

На овај начин окарактерисани и стабилизовани ензимски препарати биће коришћени за дисоцијацију ткива ферментисаних месних прехранбених производа у циљу побољшања осетљивости детекције и квантификације микроаеробног патогена *Listeria monocytogenes*.

## 5. Актуелност проблематике

Недавно је показано да је основни механизам губитка протеолитичке активности трипсина након замрзавања сама денатурација протеина до које долази на ниским температурама у киселој средини и последична агрегација протеина [1]. Промена рН вредности у благо алкалну (близу оперативне рН вредности ензима) омогућила је очување нативне структуре протеина на ниским температурама, уз минимални утицај аутолизе на губитак активности. Такође, додатак козмотропних агенаса (јони, сахариди, аминокиселине, алкохоли) у ниским концентрацијама води стабилизацији протеина у раствору [1-3]. Термалној стабилности раствора резервних протеина јајета може допринети и додавање нејонских сурфактаната као што су *Tween 20* и *Tween 80* [4].

Истраживања повезаности механизма увијања ензима и њихове активности са посебном пажњом на концепт постојања стабилних интермедијера увијања протеина (стопљених глобула) [5], конформација које се разликују од нативног стања ензима, могу пружити бољи увид у фундаменталне принципе каталитичке функције самих ензима. Стопљене глобуле задржавају удео и распоред секундарних структура, мада имају већу изложеност хидрофобних региона протеина околном растварачу. У погледу барем делимичног очувања структуре активних центара ензима и места за везивање супстрата, интермедијери дестабилизације цистеин-протеаза поседују значајан удео почетне активности приликом инкубације на ниским температурама (+4 °C) и у трајању од 21 дана. Удео почетне активности варира између 25% и 70% у зависности од саме протеазе и присутних адитива [6].

Ферментисани месни производи представљају погодно окружење за раст и размножавање широког спектра микроорганизама, укључујући патогене бактерије које се преносе храном. *L. monocytogenes* чак и у ниским дозама може изазвати листериозу, болест која погађа углавном особе са ослабљеним имунитетом, труднице и новорођенчад [7, 8]. Имајући ово у виду, одговарајућа методологија не само за квалитативно откривање, већ и квалитативно одређивање *L. monocytogenes* у прехранбеним производима је од пресудне важности. Употреба протеолитичких ензима за дисоцијацију ткива може потенцијално повећати осетљивост микробиолошких тестова [9, 10].

Приказан извод из новије научне литературе истиче значај испитивања утицаја сурфактаната на конформационе и каталитичке особине протеаза на ниским температурама. Оптимизација одговарајуће формулације која ће имати синергистичке ефекте ензима различитих супстратних специфичности и нејонских сурфактаната је од значаја за примену у детекцији и квантификацији патогених микроорганизама у ферментисаним месним производима.

## 6. Очекивани резултати

У току израде ове докторске дисертације очекују се следећи резултати:

1. Оптимизација састава пуферског система са нејонским сурфактантима за протеазне ензиме у циљу очувања структуре и активности ензима током складиштења и употребе ензима на ниским температурама.
2. Оптимизација протеолитичких формулација у погледу каталитичке активности и супстратне специфичности према природним протеинима.
3. Карактеризација структурних промена ензима, са посебним освртом на структуру и активност стопљене глобуле.
4. Повећање осетљивости детекције патогена *Listeria monocytogenes* у микробиолошким тестовима ферментисаних прехранбених производа услед примене оптимизованих ензимских формулација.

## 7. Литература

- [1] B. Rašković, S. Vatić, B. Anđelković, V. Blagojević, N. Polović, Optimizing storage conditions to prevent cold denaturation of trypsin for sequencing and to prolong its shelf life, *Biochem. Eng. J.* 105 (2016) 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.018>.
- [2] L. Momeni, S. Mahmodian, B. Shareghi, A.A. Saboury, S. Farhadian, The functional and structural stabilization of trypsin by sucrose, *Int. J. Biol. Macromol.* 99 (2017) 343-349. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.090>.
- [3] D. Usoltsev, V. Sitnikova, A. Kajava, M. Uspenskaya, FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin and Trypsin under Neutral Salts, *Biomolecules* 10(4) (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10040606>.

- [4] M. Nasabi, M. Labbafi, M.E. Mousavi, A. Madadlou, Effect of salts and nonionic surfactants on thermal characteristics of egg white proteins, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 970-976. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.102>.
- [5] M. H. N. Brumano, M. G. de Almeida Oliveira, Urea-induced denaturation of b-trypsin: an evidence for a molten globule state, *Protein Pept. Lett.* 11, 133e140 (2004) <https://doi.org/10.2174/0929866043478257>
- [6] J. Milosevic, B. Jankovic, R. Prodanovic, N. Polovic,. Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol. *Amino Acids*, 51(5) (2019) 829-838. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02724-3>
- [7] Law, J.W-F., Ab Mutalib, N-S., Chan, K-G., Lee, L-H, An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01227>
- [8] S.T. Ooi, B. Lorber, Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*, *Clin. Infect. Dis.* 40(9) (2005) 1327-1332. <https://doi.org/10.1086/429324>
- [9] Hayama, K., Maruyama, N., Abe, S, Cell preparation method with trypsin digestion for counting of colony forming units in *Candida albicans*-infected mucosal tissues. *Med. Mycol.* 50 (2012) 858-862. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.683538>
- [10] Fachmann, M.S.R., Löfström, C., Hoorfar, J., Hansen, F., Christensen, J., Mansdal, S., Josefsen, M.H., Detection of *Salmonella enterica* in Meat in Less than 5 Hours by a Low-Cost and Noncomplex Sample Preparation Method. *Appl. Environ. Microb.* 83 (2017) e03151-03116. <https://doi.org/10.1128/aem.03151-16>

### **Г. Закључак комисије**

На основу свих елемената изложених у овом извештају Комисија закључује да предложена тема има научну заснованост и уклапа се у савремене токове биохемије. Истраживања планирана у оквиру докторске дисертације мастер хемичара Саше Ватића представљају оригиналан рад који ће пружити значајан допринос у разумевању процеса утицаја нејонских сурфактаната на структуру и активност протеаза у складишним и оперативним условима.

У складу са Статутом Хемијског факултета, а имајући у виду наведено, сматрамо да кандидат Саша Ватић испуњава све потребне услове за одобравање израде докторске



дисертације. Сагласно томе, Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета да кандидату одобри израду докторске дисертације под насловом:

**„Утицај нејонских сурфактаната на структуру и активност протеаза“,**

За ментора се предлаже др Наталија Половић, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду. Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације дат је у Прилогу.

У Београду,

26. 2. 2021. године

**Комисија:**

др Наталија Половић, ванредни професор  
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

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

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

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

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

Прилог

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

Име и презиме ментора: **др НАТАЛИЈА ПОЛОВИЋ**

Звање: **ванредни професор**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације

1. Rašković B, Popović M, Ostojić S, Andjelkovic B, Tešević V, **Polović N**. Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage (2015) *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150, pp. 238-246
2. Rašković B, Vatić S, Andjelkovic B, Blagojević V, **Polović N**. Optimizing storage conditions to prevent cold denaturation of trypsin for sequencing and to prolong its shelf life (2016) *Biochemical Engineering Journal* 105: 168–176
3. Milosevic J, Prodanovic R, **Polović N**. On the Protein Fibrillation Pathway: Oligomer Intermediates Detection Using ATR-FTIR Spectroscopy (2021) *Molecules* 2021, 26(4), 970
4. Milosevic J, Jankovic B, Prodanovic R, **Polovic N**. Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol. *Amino Acids*, 51(5) (2019) 829-838
5. Raskovic B, Bozovic O, Prodanovic R, Niketic V, **Polovic N**. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex (2014) *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118 (6): 622-627