

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**Предмет:** Пријава теме докторске дисертације Алексе Савића, мастер биохемичара, студента докторских академских студија на Универзитету у Београду – Хемијском факултету, студијски програм Биохемија.

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри израду докторске дисертације из области Биохемије на Универзитету у Београду – Хемијском факултету (Катедра за биохемију) под радним насловом:

**„*In silico* предвиђање ензима са потенцијалном хидролитичком активношћу према полиетилен-терефталату и имобилизација мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* на различитим носачима за производњу моно(хидроксиетил)-терефталата”.**

За оцену научне заснованости приложене теме докторске дисертације предлажем Комисију у саставу:

1. др Јелена Радосављевић, доцент, Универзитет у Београду – Хемијски факултет (ментор);
2. др Тања Ћирковић Величковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Хемијски факултет;
3. др Милош Милчић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Хемијски факултет;
4. др Александра Маргетић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за хемију, технологију и металургију – Институт од националног значаја за Републику Србију;
5. др Јована Ковачевић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Математички факултет.

Уз молбу прилажем:

1. Биографију;
2. Библиографију;
3. Изјаву да предложена тема није пријављена на другој високошколској установи у земљи или иностранству;
4. Образложење теме.

У Београду, 22. октобар 2025. год.

---

Алекса Савић  
истраживач-приправник  
Иновациони центар  
Хемијског факултета у Београду, д.о.о.

## Биографија

### Алекса (Данијела) Савић

Алекса Д. Савић рођен је 24. 10. 1998. у Крушевцу, у Републици Србији. Основну школу „Јован Поповић” и природно-математички смер Гимназије у Крушевцу завршио је са одличним успехом.

Основне академске студије на студијском програму Биохемија на Универзитету у Београду – Хемијском факултету уписао је школске 2017/18. Одбраном завршног рада под насловом „Клонирање флуоресцентно обележеног хуманог  $\alpha$ -синуклеина у векторе за експресију у бактерији *Escherichia coli*” завршио је основне студије 2021. године и стекао звање дипломирани биохемичар. Основне академске студије завршио је са просечном оценом 9,76 (девет и 76/100) и оценом 10 на завршном раду.

Мастер академске студије на студијском програму Биохемија на Универзитету у Београду – Хемијском факултету уписао је школске 2021/22. године. Одбраном завршног рада под насловом „Оптимизација услова експресије флуоресцентно обележеног хуманог  $\alpha$ -синуклеина у бактерији *Escherichia coli*” завршио је мастер студије 2022. године и стекао звање мастер биохемичар. Мастер академске студије завршио је са просечном оценом 10,00 (десет) и оценом 10 на завршном раду.

Докторске академске студије на студијском програму Биохемија на Универзитету у Београду – Хемијском факултету уписао је 2022/23. године при Катедри за биохемију под менторством доцента др Јелене Радосављевић. До сада је положио шест од шест испита предвиђених планом и програмом са просечном оценом 10,00 (десет) и остварио 120 ЕСПБ бодова.

Запослен је на Иновационом центру Хемијског факултета у Београду, д.о.о. од 1. 3. 2023. године у звању истраживач-приправник. Од 2021/22. године ангажован је на Катедри за биохемију као сарадник у настави за извођење вежби на предметима Биохемија (409A2), Биотехнологије у животној средини (415S2) и Загађивачи хране (514S2), а од 2022/23. године и на предмету Експериментална биохемија (404B2).

Учесник је на пројектима HF-220 / 101095129 „GraspOS: процена истраживања следеће генерације за промоцију отворене науке” (2023-2025) и HF-281 „Подршка формирању Иновационог инкубатора на Универзитету у Београду – Хемијском факултету за подизање предузетничких компетенција студената и истраживача” (2023-2024).

Добитник је Дипломе Универзитета у Београду – Хемијског факултета поводом дана факултета најбољем студенту који је завршио студијски програм Биохемија у школској 2020/21. години, Дипломе „Ђорђе Стефановић” Катедре за биохемију и Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета за најбољег студента генерације на смеру Биохемија, Специјалног признања Српског хемијског друштва за изузетан успех у току студија на Хемијском факултету Универзитета у Београду и Награде Фонда за путовања младих (YTF) Федерације европских биохемијских друштава (FEBS) за подршку учешћа у FEBS-овом напредном курсу: „Computational Approaches to Understanding and Engineering Enzyme Catalysis” у Загребу, у Републици Хрватској. Поред већ наведеног курса у Загребу, учествовао је и на Биоинформатичком хакатону – BIOInforming the youth и такмичењу Challenge Labs 2023. Похађао је курс Биохемијског друштва Србије – „Биохемија у служби здравља” и обуку у лабораторији за нанобиотехнологију у Испри, Италија, под називом „Open access to JRC Research Infrastructures for Training and Capacity Building”.

Био је члан једног од шест победничких тимова пријављених на такмичењу Balkathon 4.0 (2023. године). Члан је Биохемијског друштва Србије, Српског хемијског друштва, Српског удружења за протеомику и Италијанског удружења за протеомику.

## Библиографија

### Радови у међународном часопису изузетних вредности (M21a)

1. Cvetić, T., **Savić, A.**, Jovanović, V., Prodić, I., Radosavljević, J., Sickmann, A., Smiljanić, K. (2025). Why Protein Modifications Matter for Digestibility: The Case of Ara h 1 Peanut Allergen and Trypsin Cleavage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(33), 21186-21198. doi: 10.1021/acs.jafc.5c05871

### Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

1. **Savić, A.**, Mitić, D., Smiljanić, K., Radosavljević, J., Stanić-Vučinić, D., Ćirković Veličković, T. (2024). Ensemble-based in silico allergenicity prediction of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *XVIII International Italian Proteomics Association Annual Meeting in partnership with the Hellenic Proteomics Society and Serbian Proteomics Association*, Rome, Italy, 27-29 November 2024, Italian Proteomics Society., 78-78.
2. **Savić, A.**, Mitić, D., Mladenović, M., Jovanović, V., Smiljanić, K., Ćirković Veličković, T. (2024). In silico study of allergenicity and cross-reactivity of blood clams, *Anadara broughtonii* and *Tegillarca granosa*. *XVIII International Italian Proteomics Association Annual Meeting in partnership with the Hellenic Proteomics Society and Serbian Proteomics Association*, Rome, Italy, 27-29 November 2024, Italian Proteomics Society., 67-67.
3. **Savić, A.**, Drulović, N., Radosavljević, J. (2023). Evaluation of an in-house developed colorimetric and other assays for PET-degrading activity. *"Biochemistry in Biotechnology", Twelfth Conference, International scientific meeting*, Belgrade, Serbia, 21-23 September 2023, Faculty of Chemistry, Serbian Biochemical Society., 105-105.
4. **Savić, A.**, Radosavljević, J. (2023). Solubility prediction of the PET hydrolyzing enzyme's double mutants for production in *Escherichia coli*. *International Scientific Conference: Green Agenda for Western Balkans*, Belgrade, Serbia, 20-22. June 2023, University of Belgrade - Faculty of Geography., 70-70.
5. **Savić, A.**, Stefanović, M., Slović, F., Radosavljević, J. (2023). Analysis of PET degrading enzymes by bioinformatic tools, *Biotechnology for a circular bioeconomy*, 28-29 March 2023, AFOB-EFB Virtual Conference, European federation of biotechnology., 103-103.

### Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64)

1. Stefanović, M., **Savić, A.**, Božić, N., Vujčić, Z., Radosavljević, J. (2023). Recombinant production of native  $\lambda$ -exonuclease in different *E. coli* strains. *CoMBoS2 – the Second Congress of Molecular Biologists of Serbia, Abstract Book – Trends in Molecular Biology, Special issue*, Belgrade, Serbia, 6-8 October 2023, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE), University of Belgrade., 172-172.
2. **Savić, A.**, Radosavljević, J. (2023). Densitometric analysis of protein profiles as a tool for DoE decision making for recombinant protein production. *VI Simpozijum Srpskog udruženja za proteomiku (SePA) "Razvoj i primena novih metoda proteomike"*, Kragujevac, Serbia, 2nd June 2023, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu., 24-24.
3. Stefanović, M., **Savić, A.**, Božić, N., Vujčić, Z., Radosavljević, J. (2023). Electrophoretic assessment of recombinant  $\lambda$ - exonuclease production in different *E. coli* strains. *VI Simpozijum Srpskog udruženja za proteomiku (SePA) "Razvoj i primena novih metoda proteomike"*, Kragujevac, Serbia, 2nd June 2023, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu., 23-23.

4. **Savić, A.**, Vidović, M., Radosavljević, J. (2022). Optimization of the expression conditions of fluorescently labeled  $\alpha$ -synuclein in *Escherichia coli* by response surface methodology and proteolysis by tobacco etch virus protease. *8th Conference of Young Chemists of Serbia*, Belgrade, Serbia, 29th October, 2022, Serbian Chemical Society., 10-10.
5. **Savić, A.**, Vidović, M., Radosavljević, J. (2022). Kloniranje i ekspresija fluorescentno obeleženog  $\alpha$ -sinukleina u bakteriji *Escherichia coli*. *58. Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Belgrade, Serbia, 9-10 June 2022, Serbian Chemical Society., 68-68.

## ИЗЈАВА

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**„*In silico* предвиђање ензима са потенцијалном хидролитичком активношћу према полиетилен-терефталату и имобилизација мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* на различитим носачима за производњу моно(хидроксиетил)-терефталата”**

није пријављена на другим високошколским установама у земљи или иностранству.

У Београду, 22. октобар 2025. год.

---

Алекса Савић  
истраживач-приправник  
Иновациони центар  
Хемијског факултета у Београду, д.о.о.

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**Предмет:** Образложење теме докторске дисертације кандидата Алекса Савић, мастер биохемичара, студента докторских студија (студијски програм Биохемија).

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри пријаву теме докторске дисертације под насловом:

**„*In silico* предвиђање ензима са потенцијалном хидролитичком активношћу према полиетилен-терефталату и имобилизација мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* на различитим носачима за производњу моно(хидроксиетил)-терефталата”.**

**1. Научна област:** Хемијске науке

**Ужа научна област:** Биохемија

**2. Предмет научног истраживања**

Предмет истраживања предложене докторске дисертације обухвата секвенцијалну и структурну анализу познатих ензима који катализују реакцију разградње полиетилен-терефталата (ПЕТ). Ови ензими се под једним именом називају ПЕТ хидролазе. Анализа ће бити праћена креирањем скупа тачака у тродимензионалном простору које описују физичке и хемијске карактеристике активног центра ових ензима. Уколико се скупови састоје од истог броја тачака по ензиму који су међусобно слично позиционирани у простору, омогућава се једноставно упоређивање геометрије и хемијске структуре активног места ензима. Имплементацијом оваквог програма, уз предвиђање тродимензионалне структуре протеина помоћу доступних биоинформатичких алата очекује се развијање релативно брзе методе за откривање нових ензима са ПЕТ хидролазном активношћу међу већ познатим ензимима који катализују реакцију хидролизе хемијски сродних супстрата. Као други предмет истраживања у оквиру предложене докторске дисертације испитивала би се могућност ковалентне и нековалентне имобилизације мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* на различитим носачима, са циљем креирања ефикасног биокатализатора који се може користити за производњу моно(хидроксиетил)-терефталата хидролизом бис(хидроксиетил)-терефталата и евентуално других ПЕТ нанопластика. За постизање овог циља урадила би се имобилизација на песку користећи силафински обележивач, оклудовање формирањем алгинатних, полиакриламидних и агарозних гелова, као и ковалентним везивањем за уобичајене матриксе за гел филтрацију типа Sepharose и Sephadex.

**3. Основне хипотезе**

Због пожељних физичко-хемијских особина, пластични материјали су у последњих пар деценија постали незаменљиви у свакодневној животној употреби. Због широке употребе и неправилног одлагања пластичног отпада, дошло је до драстичне акумулације овог типа материјала у животној средини. Методе које се тренутно користе за уништавање отпада пореклом од пластичних материјала углавном се заснивају на употреби екстремних реакционих услова (висока температура, концентроване киселине и базе, употреба

токсичних катализатора) [1], те су скупе и у случају неправилне примене ослобађају изузетно штетне производе за животну средину. Због тога су истраживања тренутно фокусирана на развоју ензима и микроорганизама који би могли пружити исплативу и ефикаснију алтернативу наведеним процесима. Овакви ензими називају се ПЕТ хидролазе.

Број експериментално потврђених ензима за које се тренутно зна да катализују реакцију хидролизе полиетилен-терефталата је врло ограничен (311 ензима наведених у бази података PASY (7. 10. 2025.)) [2]. Како би се развили ефикаснији мутанти познатих ензима, неопходан је већи број матричних ензима за употребу као полазних тачака за примену биоинформатичких и биотехнолошких методологија [3]. Пошто скоро све тренутно познате ПЕТ хидролазе припадају поткласама карбоксилестераза, липаза и кутиназа [1], може се очекивати да међу другим већ познатим ензимима ових поткласа постоји још ензима који би могли да катализују реакцију хидролизе ПЕТ-а. Сви тренутно познати ензими овог типа поседују висококонзервирани мотив секвенце GX SXG у активном месту, који у тродимензионалној структури овог протеина одговара прелазу са  $\alpha$ -хеликса на  $\beta$ -плочицу, са каталитичким серином као централним остатком [4]. Стога, за очекивати је да се каталитички серин може лако лоцирати секвенцијалним поравнањем секвенци са клизећим прозором од пет аминокиселинских остатака.

У последњих пар година су развијени алати за предвиђање тродимензионалне структуре протеина који предвиђају моделе упоредиве са експериментално одређеним структурама [5]. Коришћењем графичких процесорских јединица (GPU), неки од ових алата у разумном временском периоду моделују структуру, те је могуће развити програме који укључују ове алате као један од корака за примену на великом броју протеина [6-8]. Услед тога претпоставља се да је могуће креирати програм који употребом оваквих алата предвиђа 3D структуру ензима, затим на основу секвенце употребом већ поменутог приступа проналази GX SXG мотив и тродимензионално поравнава ензим са референтним ензимом користећи висококонзервиране остатке глицина и серина за дефинисање транслационе и ротационе матрице неопходне за поравнање активних места.

У следећем кораку могуће је формирање скупа правилно распоређених тачака у тродимензионалном Еуклидовом простору, центрираних на остатку каталитичког серина. Површинским аминокиселинским остацима могу се доделити бројеви који одговарају њиховим различитим физичко-хемијским или хемијским особинама (нпр. запремина бочног остатка, присуство наелектрисања при датој рН вредности, ароматичност, хидрофобност, могућност да остатак буде дозор или акцептор водоничне везе и друге). Сабирањем или упросечивањем ових вредности за све аминокиселинске остатке који су у непосредној близини сваке од тачака може се добити скуп дескриптора који одсликава геометрију и електростатичку структуру активног места. Како су број и позиција тачака између било која два ензима идентични, наведени скупови се могу сматрати међусобно секвенцијално спареним и за њих се могу лако израчунавати метрике сличности.

Програм који ће бити развијен биће искоришћен за обрађивање одабраних протеина из фамилије  $\alpha/\beta$ -хидролаза и генерисање скупова дескриптора ових ензима на горе описан начин. Поређењем ових скупова са скуповима одабраних већ познатих ПЕТ хидролаза предвидеће се њихова могућност хидролизе полиетилен-терефталата.

Како би процес биохемијске разградње пластике постао исплатљивији на већим скалама, пожељно је обезбедити коришћење ензима више пута. Ово је могуће постићи имобилизацијом ензима на чврстим носачима, чиме се омогућава једноставно физичко раздвајање катализатора од реакционе смеше по завршетку реакције и његова поновна употреба у следећој [9]. Имобилизација ензима често доводи и до повећане стабилности ензима [10].

Имобилизација се може извести адсорпцијом ензима на површину различитих материјала као што су силика, диатомејска земља, оксиди метала, хидроксиапатит, хитин, хитозан, скроб, алгинат, целулоза, колаген, агар, полиакриламид, епокси смоле, јоноизмењивачи и други. Главни недостатак ове методе јесте то што је ензим врло слабо везан за површину носача, те се са њега може испрати након малог броја коришћења или променом услова (температура, јонска сила, рН вредност и сл.) [9, 11]. Такође, ензим се након адсорпције или слободан у раствору може умрежити применом бифункционалних агенаса као што су глутаралдехид и 4,4'-бифенилбис(диазонијум) јон. На овај начин настају нерастворни агрегати ковалентно умрежених протеина са лошим механичким особинама. Овакав приступ је често неислатив јер се велики део ензима инактивира, па је потребна велика количина ензима [9, 12]. Такође, ензим може бити оклудован заробљавањем у полимерном матриксу. Најчешћи материјали који се користе за оклудовање су калцијум-алгинат, полиакриламид и агароза. Овакав приступ такође доводи до цурења ензима, али у мањем степену у односу на адсорпцију, јер је ензим заробљен дубље унутар структуре полимера. Такође треба узети у обзир да супстрат мора да дифундује у унутрашњост материјала како би дошао у контакт са ензимом, што је са већим супстратима отежано [9, 13]. Ковалентна имобилизација подразумева ковалентно везивање ензима на површину неког чврстог носача, најчешће природних материјала као што су скроб, колаген, агароза, целулоза, декстран и други. Ова метода обично доводи до највећег повећања стабилности наспрам осталих, горе наведених метода, али често и до највећег губитка активности током самог процеса, делом као последица услова хемијске реакције, а делом и услед денатурације и потенцијално неправилне оријентације ензима током везивања за матрикс [9, 14].

Како су микро и наночестице пластике нерастворне у води и знатно веће од молекула ензима, приликом избора методе имобилизације мора се водити рачуна о томе да ензим не буде превише стерно ограничен како би могао да у довољној мери приступи супстрату. Метода ковалентне имобилизације са довољно дугачком спејсерском руком уз продужени контакт између честица матрикса и супстрата би потенцијално могао да обезбеди прихватљиве услове за одвијање реакције. Међутим, најлогичнији избор методе имобилизације је свакако адсорпција на површину носача. Због слабе природе ове интеракције, може се очекивати да се ензим делимично распоређује између површине носача, раствора и површине супстрата.

Пример јефтиног материјала доступног у великим количинама, а који се свакако користи на великим скалама за грубо филтрирање воде у почетним фазама пречишћавања јесте песак [15]. Стога, имобилизацијом ПЕТ хидролазе на песак би се могло добити економски исплативо решење за пречишћавање воде од заосталих микро и нанопластика након филтрирања. Логичан избор ензима за овакав процес био би ензим који показује релативно високу активност при нижим температурама, међу којима је најефикаснија ПЕТаза из *Piscinibacter sakaiensis*.

Како би се ензим имобилизовао на песку као носачу, приликом производње рекомбинантног протеина могуће га је фузионисати са R5 силафинским пептидом. Да би се постигла адекватна расподела ензима између супстрата и силиката из песка, протеин ће бити фузионисан са једном, две или три копије овог пептида [16]. Пошто је главни тип међумолекулске интеракције који се формира између силиката и R5 обележивача електростатичка интеракција, афинитет протеина према носачу се може додатно регулисати променом температуре реакционог система, пружајући могућност одвијања реакције у циклусима. Повећањем температуре се истовремено повећава брзина реакције, али и смањује јачина електростатичких интеракција, водећи већем степену десорпције са носача, након чега се смањењем температуре поново фаворизује адсорпција ензима назад на носач.

Како је финални производ реакције катализоване ПЕТазом моно(хидроксиетил)-терефталат, добијени имобилизати се потенцијално могу искористити за ефикасну производњу овог једињења полазећи од бис(хидроксиетил)-терефталата или микро и нанопластике. Ово

једињење није доступно на тржишту по приступачним ценама, те би развијање економичног начина производње допринело смањењу цене овог једињења, што би омогућило његову ширу примену у органским синтезама и за добијање бољих аналитичких стандарда.

#### 4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Главни циљеви ове докторске дисертације су креирање програма који на основу секвенце датог протеина предвиђа да ли он може или не може катализовати реакцију хидролизе полиетилен-терефталата, као и испитивање могућности коришћења имобилизованог мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* за производњу моно(хидроксиетил)-терефталата.

Резултати ове докторске дисертације би могли водити добијању нових ПЕТ хидролаза међу већ познатим ензимима других поткласа, обезбеђујући нове референтне ензиме за примену у биоинформатичким и биотехнолошким методама. Додатно, као резултат очекује се стварање новог, економичног биокатализатора који се може применити у сврхе производње моно(хидроксиетил)-терефталата и потенцијалне индустријске примене за рециклажу ПЕТ пластике.

##### Специфични циљеви истраживања су:

- 1) Креирање програма за идентификацију каталитичког серина ПЕТ хидролазе дате секвенце, предвиђање тродимензионалне структуре и тродимензионално поравнање активних места ензима;
- 2) Креирање програма који за дати ензим поравнат са референтним ензимом генерише скуп тачака и њима додељује вредности које описују физичке и хемијске особине активног места датог ензима;
- 3) Употреба развијених програма на свим тренутно доступним ензимима из базе података PAZy ([pazy.eu/doku.php?id=pet](http://pazy.eu/doku.php?id=pet)) и њихово груписање на основу метрика сличности између генерисаних скупова тачака;
- 4) Креирање програма за предвиђање могућности хидролизе полиетилен-терефталата од стране ензима дате секвенце коришћењем горе описаних програма;
- 5) Дизајнирање вектора за експресију мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* обележеног хексахистидинским обележивачем и са три копије R5 силафинског пептида;
- 6) Добијање вектора за експресију мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* обележеног хексахистидинским обележивачем и са две, једном или ниједном копијом R5 силафинског пептида, полазећи од вектора описаног претходном тачком;
- 7) Експресија и пречишћавање мутанта ПЕТазе из *Piscinibacter sakaiensis* обележеног хексахистидинским обележивачем и са три, две, једном или ниједном копијом R5 силафинског пептида;
- 8) Имобилизација пречишћених протеина на различите носаче адсорпцијом или ковалентним везивањем;
- 9) Испитивање могућности коришћења имобилизата за разградњу бис(хидроксиетил)-терефталата и микрочестица полиетилен-терефталата, као и за производњу моно(хидроксиетил)-терефталата.

## 5. Методе истраживања

У току израде ове докторске дисертације биће коришћене следеће методе:

**Биоинформатичке методе:** База података PAFy ([pafy.eu/doku.php](http://pafy.eu/doku.php)) биће коришћена за прикупљање секвенци експериментално потврђених ПЕТ хидролаза. База података UniProt ([uniprot.org](http://uniprot.org)) биће коришћена за прикупљање секвенци одабраних ензима чија ће могућност деградације полиетилен-терефталата бити предвиђена развијеним програмом. Програмски језик Python ће бити коришћен за кодирање свих програма, са коришћењем свих релевантних модула, као што су numpy и pandas за рад са подацима, seaborn и matplotlib за исцртавање графика, Biopython за рад са протеинским секвенцама, freesasa за одређивање растварачу доступне површине аминокиселинских остатака и ru3Dmol за визуализацију тродимензионалне структуре протеина.

**Микробиолошке методе:** Уобичајене микробиолошке методе биће коришћене за пресејавање, гајење и чување бактеријских сојева. За пропагацију плазида користиће се сој *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , а за експресију протеина *Escherichia coli* BL21(DE3). Трансформација бактерија биће изведена употребом хемијске методе трансформације компетентних ћелија.

**Молекуларно-биолошке методе:** За изоловање плазмидне ДНК из бактеријских култура користиће се комерцијално доступан кит заснован на минипреп протоколу са колонама за пречишћавање плазида. Ген за експресију мутанта ПЕТАзе из *Piscinibacter sakaiensis* са хексахистидинским обележивачем и три копије R5 силафинских пептида биће наручен и добављен као уклонирани у rRSFDuet-1 или другом адекватном вектору, након чега ће рестрикцијом овог плазида одговарајућим рестрикционим ендонуклеазама праћеном интрамолекуларном лигацијом бити добијени и плаزمиди који кодирају овај протеин са две, једном, односно ниједном копијом R5 силафинског пептида. За раздвајање и анализу ДНК користиће се агарозна електрофореза. За пречишћавање дигестованих фрагмената ДНК користиће се кит за изоловање ДНК из гела заснованог на употреби ДНК везујућег матрикса.

**Биохемијске методе:** Жељени протеини биће добијени експресијом у *Escherichia coli* BL21(DE3) трансформисаном наведеним плазмидима. Након експресије, бактерије ће бити лизирани сонијацијом на леду, а протеини из лизата пречишћени имобилизованом метал афинитетном хроматографијом (IMAC) или употребом песка дефинисаног хемијског састава и физичких карактеристика. Концентрације протеина у растворима биће одређене употребом Брадфордове методе. Протеински састав аликуота биће анализиран употребом натријум-додецилсулфат полиакриламидне гел електрофорезе (SDS-PAGE). Активност ензима биће анализирана употребом спектрофотометријског есеја хидролизе *p*-нитрофенилацетата, дифузионим есејима на агарним плочама са импрегнираним бис(хидроксиетил)-терефталатом и есејом хидролизе ПЕТ микрочестица уз спектрофотометријско праћење апсорбанце супернатанта након центрифугирања реакционе смеше или анализом истог употребом течне хроматографије високих перформанси (HPLC). За испитивање активности имобилизованих ензима при различитим условима биће коришћене микрочестице полиетилен-терефталата, односно бис(хидроксиетил)-терефталат.

**Хемијске методе:** Микрочестице ПЕТ пластике биће припремљене растварањем пластике боца за воду у трифлуорсирћетној киселини и преципитацијом постепеним додатком воде. Танкослојна хроматографија (TLC) на комерцијалним плочицама са силика гелом биће коришћена за квалитативну анализу тока реакције хидролизе ПЕТ микрочестица и бис(хидроксиетил)-терефталата. За ковалентну имобилизацију ензима на чврсте носаче користиће се карбодиимидна хемија, реакције формирања Шифових база и друге. За нековалентну имобилизацију ензима, песак, целит и други материјали дефинисаног хемијског састава и физичких карактеристика ће бити додати у концентровани раствор ензима или ће ензим бити оклудован употребом агарозе или алгината.

## 6. Литература

- [1] N.F.S. Khairul Anuar, F. Huyop, G. Ur-Rehman, F. Abdullah, Y.M. Normi, M.K. Sabullah, R. Abdul Wahab, An overview into polyethylene terephthalate (PET) hydrolases and efforts in tailoring enzymes for improved plastic degradation, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022) 12644.
- [2] P.C.F. Buchholz, G. Feuerriegel, H. Zhang, P. Perez-Garcia, L.-L. Nover, J. Chow, W.R. Streit, J. Pleiss, Plastics degradation by hydrolytic enzymes: The plastics-active enzymes database—PAZy, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 90 (2022) 1443-1456.
- [3] E. Erickson, J.E. Gado, L. Avilán, F. Bratti, R.K. Brizendine, P.A. Cox, R. Gill, R. Graham, D.-J. Kim, G. König, W.E. Michener, S. Poudel, K.J. Ramirez, T.J. Shakespeare, M. Zahn, E.S. Boyd, C.M. Payne, J.L. DuBois, A.R. Pickford, G.T. Beckham, J.E. McGeehan, Sourcing thermotolerant poly(ethylene terephthalate) hydrolase scaffolds from natural diversity, *Nature Communications*, 13 (2022) 7850.
- [4] X. Han, W. Liu, J.-W. Huang, J. Ma, Y. Zheng, T.-P. Ko, L. Xu, Y.-S. Cheng, C.-C. Chen, R.-T.J.N.c. Guo, Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase, *Nature Communications*, 8 (2017) 2106.
- [5] A. Kryshchak, T. Schwede, M. Topf, K. Fidelis, J. Moult, Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)—Round XV, *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*, 91 (2023) 1539-1549.
- [6] Z. Lin, H. Akin, R. Rao, B. Hie, Z. Zhu, W. Lu, N. Smetanin, R. Verkuil, O. Kabeli, Y. Shmueli, A. dos Santos Costa, M. Fazel-Zarandi, T. Sercu, S. Candido, A. Rives, Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model, *Science*, 379 (2023) 1123-1130.
- [7] H. Park, P. Patel, R. Haas, E. Huerta, APACE: AlphaFold2 and advanced computing as a service for accelerated discovery in biophysics, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121 (2024) e2311888121.
- [8] B. Zhong, X. Su, M. Wen, S. Zuo, L. Hong, J. Lin, ParaFold: Paralleling AlphaFold for Large-Scale Predictions, *HPCAsia '22 Workshops*, (2022) 1–9.
- [9] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*, 3 (2013) 1-9.
- [10] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (2007) 1451-1463.
- [11] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption*, 20 (2014) 801-821.
- [12] R.A. Sheldon, R. Schoevaart, L.M. Van Langen, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review), *Biocatalysis and Biotransformation*, 23 (2005) 141-147.
- [13] A. Sassolas, A. Hayat, J.-L. Marty, Enzyme Immobilization by Entrapment Within a Gel Network, in: J.M. Guisan (Ed.) *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, Humana Press, Totowa, NJ, 2013, pp. 229-239.
- [14] T. Prabhakar, J. Giaretta, R. Zulli, R.J. Rath, S. Farajikhah, S. Talebian, F. Dehghani, Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective, *Chemical Engineering Journal*, 503 (2025) 158054.

- [15] M. Umar, C. Singdahl-Larsen, S.B. Ranneklev, Microplastics removal from a plastic recycling industrial wastewater using sand filtration, *Water*, 15 (2023) 896.
- [16] C.J. Henderson, E. Pumford, D.J. Seevaratnam, R. Daly, E.A.H. Hall, Gene to diagnostic: Self immobilizing protein for silica microparticle biosensor, modelled with sarcosine oxidase, *Biomaterials*, 193 (2019) 58-70.