УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај Комисије за оцену докторске дисертације Марије (Радивој) Кокић, мастер биохемичара.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одржаној 10. септембра 2026. године, одлука бр. 403/7, одређени одређени смо за чланове Комисије за оцену докторске дисертације из Биохемије, кандидаткиње Марија (Радивој) Кокић, мастер биохемичара, пријављене под насловом:

"Унапређење биокаталитичке разградње биополимера поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине)"

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду на седници одржаној 27. јуна 2024. године, на захтев Хемијског факултета, дало је сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број: 61206-2396/2-24).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Марије (Радивој) Кокић написана је на српском језику, на укупно 110 страна, А4 формата (фонт *Times New Roman* величине 12 pt, са проредом 1 и маргинама 2 cm). Докторска дисертација је подељена на 7 поглавља: 1. Увод (2 стране); 2. Преглед литературе (20 страна); 3. Циљеви истраживања (1 страна); 4. Материјал и методе (18 страна); 5. Резултати и дискусија (47 страна); 6. Закључци (2 стране); 7. Литература (19 страна). Такође, текст дисертације садржи 52 слике, 20 табела и 241 литературна цитата. Поред наведеног, он обухвата и насловну страну на српском и енглеском језику (2 стране), страну која садржи имена чланова комисије (1 страна), захвалницу (1 страна), сажетак на српском и енглеском језику (по 1 страна), садржај (3 стране), листу скраћеница и акронима (3 стране), биографију кандидата (1 страна), изјаву о ауторству (1 страна), изјаву о истоветности (1 страна) и изјаву о коришћењу (2 стране). Дисертација је по својој структури и садржају у потпуности у складу са стандардима прописаним од стране Универзитета у Београду.

У поглављу **Увод** описан је општи оквир докторске дисертације. У овом поглављу истакнут је проблем акумулације пластичног отпада као једног од најзначајнијег изазова савременог доба, али и развој биополимера као алтернативних материјала који нуде додатне опције за управљање пластичним отпадом, са посебно истакнутим осврtом на тренутне производне капацитете и стратегије разградње поли(хидроксиалканоата) PHA и поли(млечне киселине) PLA. Указано је на значај ензимске разградње као приступа са потенцијалом да олакша неке од ограничења тренутних стратегија производње и разградње PHA и PLA, са осврtом на кључна сазнања о ензимској разградњи пластике у ширем контексту, као и о PHA- и PLA-деполимеразама у ужем контексту. Такође, у овом поглављу дефинисан је предмет

истраживања дисертације у складу са кључним питањима која произилазе из описаног оквира истраживања у области ензимске разградње PHA и PLA, као и пластике у ширем контексту.

Поглавље **Преглед литературе** обухвата релевантне теоријске и научне основе неопходне за разумевање истраживане теме дисертације. Он је подељен у десет целина које обухватају: 1. Проблеме пластичног отпада, 2. Ензимску и микробиолошку разградњу пластике – преглед и кључна сазнања, 3. Биополимере као алтернативу конвенционалној пластици, 4. Поли(хидроксиалканоате), 5. Поли(млечну киселину), 6. Биокаталитичку разградњу пластике – механизам процеса и фактори који утичу на ефикасност, 7. PHA-деполимеразе, 8. PLA-деполимеразе, 9. Аналитичке методе за праћење и квантификацију биокаталитичке разградње пластике, 10. Протеинско инжењерство за индустријску примену ензима. Кроз сажет преглед досадашњих истраживања у наведеним областима дата је и полазна основа за дефинисање циљева истраживања ове докторске дисертације.

У поглављу **Циљеви истраживања** дефинисани су општи циљеви истраживања дисертације у складу са предметом истраживања докторске дисертације, а проистекли из прегледа доступне литературе. Први циљ обухвата селекцију ензима за разградњу PHA и PLA и одабир одговарајућих експресионих система и услова експресије за даљи експериментални рад. Као важан циљ наведено је и успостављање методологије за праћење ензимске и бактеријске активности на полимерним супстратима и примену модел једињења за стандардизовану карактеризацију полимер-деградирајућих ензима. Такође, дефинисани циљеви укључују идентификацију кључних аминокиселинских остатака одговорних за специфично препознавање и хидролизу биополимерних супстрата, али и за стабилизацију ензима комбинованом применом биоинформатичких и експерименталних метода, и на крају и развој побољшаних варијанти ензима. Додатно, у циљу унапређења ефикасности биокаталитичког процеса испитане су и могућности примене предтретмана полимера и оптимизације реакционих услова ензимске хидролизе.

Поглавље **Материјал и методе** обухвата детаљан опис коришћених хемикалија, бактеријских сојева, прајмера, вектора, као и експерименталних и рачунарских процедура и метода и статистичке анализе добијених података. Поглавље је организовано у пет целина: 1. Материјали, 2. Биокаталитичка разградња PHA, 3. Биокаталитичка разградња PLA, 4. Биоинформатичка и структурна анализа протеина, 5. Статистичка анализа података. У поглављу Материјали детаљно су описане коришћене хемикалије, бактеријски сојеви, прајмери и вектори. У поглављима Биокаталитичка разградња PHA и Биокаталитичка разградња PLA специфично су описане коришћене експерименталне процедуре и методе за проучаване PHA- и PLA- деполимеразе и друге ензиме који су коришћени за упоредну анализу разградње PHA и PLA. У поглављу Биоинформатичка и структурна анализа протеина су додатно описане коришћене рачунарске процедуре и методе, као и статистичка анализа података за проучавање интеракција PHA- и PLA- деполимераза са PHA, PHA модел једињењима и PLA. Такође, у овом поглављу описана је упоредна анализа секвенци експериментално добијених мутаната PHO (поли(3-хидроксиоктаноат))-деполимеразе пореклом из *Pseudomonas fluorescens* GK13 (PfPHOазе). У поглављу Статистичка анализа података описане су коришћене методе за статистичку анализу експериментално добијених података и начин њеног приказивања кроз резултате докторске дисертације.

У поглављу **Резултати и дискусија** сажето су приказани добијени експериментални резултати истраживања, као и њихова компаративна анализа са доступном литературом у циљу процене њиховог значаја. Поглавље је подељено у две целине: 1. Биокаталитичка разградња PHA и 2. Биокаталитичка разградња PLA. У оквиру прве целине Биокаталитичка разградња PHA приказани су, и у односу на постојеће научне податке дискутовани добијени резултати о рекомбинантној експресији PfPHOазе и других ензима активних на поли(естрима) и њиховим стратегијама пречишћавања. У оквиру прве целине описано је и праћење ензимске активности у циљу стандардизације и брзе детекције PHO деградујуће активности, као и компаративне анализе PHO модел једињења и PHO полимера. Такође, описана је ефикасност различитих стратегија протеинског инжењерства у развоју варијанти PfPHOазе са унапређеним својствима за потребе разградње PHO, карактеризација добијених варијанти PfPHOазе, као и идентификација кључних аминокиселина за специфично препознавање PHO кроз комбиновање експерименталних и рачунарских метода. У другој целини Биокаталитичка разградња PLA описана је ефикасност разградње PLA предмета потрошачког квалитета помоћу комерцијално доступних препарата PLA-деполимераза, заједно са физичко-хемијским карактеристикама коришћених PLA узорака, као и анализа синергистичког дејства више ензима. У истој целини описана је примена предтретмана ултразвуком на брзину ензимске хидролизе и степен конверзије у мономер млечне киселине. Додатно, описани су ефикасност, механизам и специфичност разградње PLA помоћу Савиназе, као одабраног најефикаснијег ензима, и њена активност је анализирана у поређењу са Протеиназом К, као стандардног ензима коришћеног у литератури о ензимској разградњи PLA. Описано је испитивање потенцијала за унапређење адсорпције на PLA и имобилизације на PHA кроз фузионисање Савиназе са супстрат везујућим доменима PHA-деполимераза.

У поглављу **Закључци** дат је сажет преглед најважнијих резултата добијених у оквиру ове докторске дисертације уз нагласак на њихов значај.

Део **Литература** садржи релевантне цитате радова из области истраживања и обухвата све литературне наводе који нису део оригиналних резултата приказаних у овој дисертацији.

Б. Кратак приказ резултата дисертације

Главни резултати ове докторске дисертације представљају развој нових ензимских варијанти PHO-деполимеразе пореклом из *Pseudomonas fluorescens* GK13 (PfPHOаза) за разградњу PHO и оптимизација реакционих услова за разградњу PLA потрошачког квалитета коришћењем Савиназе као комерцијално доступног ензима који се тренутно примењује и индустрији детерџената. Додатно, потврђена је могућност примене PHO модел једињења, pNP-PHO-мономера и pNP-PHO-димера, за специфичну и убрзану детекцију PHO-деполимераза, као и у циљу олакшане стандардизације праћења активности PHO-деполимераза. Комбиновањем експерименталних и рачунарских метода идентификоване су аминокиселине одговорне за високо специфично препознавање PHO и PLA као супстрата од стране PHO-деполимеразе, односно Савиназе.

У првом делу истраживања, усмереном на унапређење биокаталитичке разградње PHA, на основу прегледа литературе одабрана је PfPHOаза као најбоље окарактерисаних mcl-PHA-деполимераза и успостављен је систем за њену производњу у ћелијама *Escherichia coli*. Међу испитаним сојевима, *E. coli* BL21(DE3) RIPL показао је стабилну експресију и највећи принос експресије овог ензима, што је било важно за даље испитивање утицаја мутација на

ензимску активност у тесту високе процесивности са целим ћелијама, али и за рекомбинантну производњу ензима за даљи рад.

У карактеризацији PfPHOазе први пут су примењени модел једињења, pNP-PHO-мономер и pNP-PHO-димер. Њихова употреба омогућила је директно и брзо праћење ензимске хидролизе и детекцију специфичне PHO-деградујуће активности, укључујући и услове у присуству детерџената при којима није могуће пратити активност на PHO. На овај начин показан је значај модел једињења за карактеризацију ензима који делују на полимерне супстрате који имају сложену структуру, а додатно значајно у случају PHA-деполимераза које карактерише мултидоменска структура.

Испитане су три стратегије протеинског инжењерства — диригована еволуција, консензус дизајн и реконструкција предачких секвенци (ASR). Њиховим директним поређењем на PfPHOази показано је да ASR даје највеће побољшање термостабилности. Диригованом еволуцијом идентификоване су супституције на позицијама 147 и 158 које су довеле до губитка активности PfPHOазе, што указује на њихов значај за везивање и/или хидролизу супстрата. Wild type и мутантне варијанте PfPHOазе добијене помоћу ASR произведени су у ћелијама *E. coli* BL21(DE3) RIPL, а добијени ензими су пречишћени и окарактерисани. Истовремено је код добијених варијанти уочен компромис између каталитичке ефикасности и термостабилности, док је паралелно са повећањем термостабилности повећана и супстрата специфичност према PHO. Даљом анализом структуре и еволуције PfPHOазе идентификовани су Ser60, Phe104, Ser182, Ile209 и Val209 као аминокиселине значајне за специфично препознавање PHO. Анализа еволуционе историје PfPHOазе указала је да секундарна активност PfPHOазе према PCL-у представља новију функционалну особину.

Симулације молекулске динамике комплекса PfPHOазе са PHO димером идентификовале су остатке Ser81, Phe125, Ile171 и Val230 као потенцијално значајне за специфично препознавање PHO.

Други део дисертације био је усмерен на унапређење биокаталитичке разградње PLA применом Савиназе, као протеолитичког ензима који налази примену у индустрији детерџената. По први пут су одређени оптимални услови за активност Савиназе као PLA-деполимеразе. Ефикасна хидролиза PLA постигнута је при pH 8,5 и 42 °C, уз специфичност према PLA и изостанак хидролизе PCL-а, PHO-а и PHB-а. Анализа структуре ензима указала је на значај аминокиселинских остатака Ser125, Ala152, Asn155 и Leu217 за специфично препознавање PLA.

Испитивање разградње потрошачких узорака PLA помоћу Савиназе показало је да начин процесирања полимера утиче на његову подложност ензимској хидролизи. Овај резултат указује да, поред избора ензима, својства и начин производње полимерног материјала представљају важне факторе за развој биокаталитичких процеса разградње PLA.

Додатно је испитан предтретман PLA ултразвуком. Резултати су показали да овај приступ може повећати брзину ензимске разградње и унапредити конверзију PLA у мономер млечне киселине при мезофилним условима на 42 °C.

Резултати добијени применом Савиназе такође показују да се индустријски већ успостављени ензими могу пренаменити за разградњу PLA отпада без додатног протеинског инжењерства.

Сумирано, резултати ове дисертације показују да комбинација предтретмана полимера, протеинског инжењерства, оптимизације реакционих услова и примене модел супстрата може допринети бољем разумевању и развоју ефикаснијих процеса биокаталитичке разградње PHA и PLA. Специфичност PfPHOазе према PHO и Савиназе према PLA у односу на друге поли(естре) показује потенцијал за комбиновање PHA- и PLA- деполимераза у интегрисаном приступу разградње мешовитог биополимерног отпада.

B. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Као алтернатива петрохемијској пластици развијени су биополимери, међу којима се поли(хидроксиалканоати) (PHA) и поли(млечна киселина) (PLA) издвајају захваљујући могућности производње из обновљивих ресурса и подложности ензимској разградњи (1). Међутим, увођење нових материјала на тржиште мора бити праћено развојем стратегија њиховог уклањања и рециклаже, како би се спречила њихова акумулација у животној средини и настанак микропластике. Од 8300 милиона тона конвенционалне петрохемијске пластике произведене до 2017. године, 79% се трајно акумулирало у животној средини (2), што представља један од значајних глобалних еколошких проблема. У том контексту, биокаталитичка, односно ензимска деполимеризација представља приступ који поред уклањања полимерног отпада омогућава регенерацију ослобођених мономера за производњу нових биоматеријала или других биопроизвода (3). Иако су PHA и PLA развијени као алтернативе конвенционалној пластици, њихова биоразградивост не подразумева нужно брзу или потпуну разградњу у условима животне средине (1). Због тога је развој контролисаних биокаталитичких процеса од значаја за примену PHA и PLA као алтернативних полимерних материјала. Резултати ове докторске дисертације уклапају се у овај правац истраживања, показујући да се унапређење биокаталитичке разградње PHA и PLA може постићи применом предтретмана полимера, протеинског инжењерства и оптимизације реакционих услова.

У циљу унапређења биокаталитичке разградње PHA, у овој дисертацији проширена су сазнања о стратегијама протеинског инжењерства PHA-деполимераза и кључним аминокиселинама које доприносе њиховој активности. За проучавање ензимске деполимеризације PHO, као mcl-PHA који не показује разградњу у условима животне средине, одабрана је PHO-деполимераза из *Pseudomonas fluorescens* GK13 (PfPHOаза). Овај ензим представља једну од најбоље окарактерисаних mcl-PHA-деполимераза, класе ензима која је знатно мање проучена у односу на scl-PHA-деполимеразе. Досадашња истраживања PHA-деполимераза била су усмерена на биохемијску карактеризацију ензима и функционалне студије засебних домена укључених у везивање и хидролизу полимера кроз испитивање губитка активности након увођења мутација најчешће у структуру scl-PHA-деполимераза. Много је мање доступних података о аминокиселинама које одређују специфичност према mcl-PHA. Стога, у овој дисертацији идентификоване су аминокиселине PfPHOазе кључне за специфично препознавање PHO, а протеинско инжењерство примењено је за развој варијанти PfPHOазе са побољшаним својствима. Додатно, применом реконструкције предачких секвенци (ASR) на PfPHOазу по први пут је испитан еволутивни развој биокаталитичких карактеристика PHA-деполимераза, укључујући термостабилност, активност и супстратну специфичност. Додатно је испитан потенцијал за добијање унапређених варијанти PfPHOазе применом три приступа протеинског инжењерства: дириговане еволуције, консензус дизајна и реконструкције

предачких секвенци (ASR). Најактивнији мутанти добијени су ASR приступом, а такође су показали и највеће повећање термостабилности.

Применом ASR приступа термостабилност мезофилне PfPHOазе унапређена је за приближно 30 °C, чиме је достигнута температура инактивације карактеристична за најтермофилније PHA-деполимеразе до сада описане у природи (4).

У литератури је претходно, у складу са добијеним резултатима ове дисертације, описана активност PfPHOазе према PHO и PHO-PHD кополимеру, док активност према PHB, PHBV и њиховим кополимерима није забележена. Такође, PfPHOаза у мањој мери разграђује и PCL, што је такође описано и за друге mcl-PHA-деполимеразе из *Streptomyces roseolus* SL3 и *Pseudomonas alcaligenes* LB19 (5). Добијени резултати анализе еволуционе историје PfPHOазе указали су да је активност PfPHOазе на PCL више изражена код еволутивно млађих варијанти ензима.

Код мутаната PfPHOазе добијених помоћу ASR уочен је компромис између каталитичке ефикасности и стабилности, при чему су варијанте са побољшаном термостабилношћу показале и повећање супстратне специфичности. Ови резултати указују на потенцијал ASR за добијање селективних и стабилних биокатализатора за разградњу PHO кроз реконструкцију предачких варијанти савремених ензима.

Једно од важних методолошких питања у истраживању PHA-деполимераза јесте избор супстрата за мерење активности (6). Директно праћење хидролизе полимера је захтевно због хетерогености полимерних супстрата, њихове слабе растворљивости и зависности активности ензима од физичких својстава полимера. У овој дисертацији први пут је испитана примена PHO модел једињења, pNP-PHO-мономера и pNP-PHO-димера, за стандардизацију и директну квантификацију специфичне PHO-деградујуће активности хидролитичких ензима активних на поли(естрима). PfPHOаза је показала 5,8 пута већу активност према PHO-мономеру и 3,3 пута већу активност према PHO-димеру у поређењу са pNP-октаноатом, док је LCC^{ICCG} који не показује способност хидролизе PHO показао супротан тренд са PHO модел једињењима. Поред убрзане детекције у односу на PHO, примена PHO модел једињења додатно омогућава детекцију активности у присуству детерџената, што је значајно за рад са хидрофобним PHA-деполимеразама.

Ензимска разградња PLA је до сада најчешће проучавана коришћењем Протеиназе K (7), док је потенцијал других комерцијалних ензима мање истражен. У циљу унапређења биокаталитичке разградње PLA испитана је пренамена Савиназе, индустријски примењене протеазе, за разградњу PLA узорака потрошачког квалитета. У том контексту, примена Савиназа олакшава скалирање процеса ензимске разградње PLA због већ развијеног процеса њене производње на великој скали. Претходно је активност Савиназе и других комерцијалних протеаза испитивана на 50 °C, при оптималној температури за Протеиназу K (8), док оптимални услови за разградњу PLA помоћу Савиназе и других комерцијалних протеаза нису били испитани.

Резултати ове дисертације показали су да Савиназа ефикасно хидролизује PLA при оптималној температури од 42 °C и pH 8,5. Ови услови су у складу са литературним вредностима за друге алкалне протеазе које показују активност према PLA при pH вредностима 8–9 и температурама 37–60 °C (9). Резултати такође показују да је контрола

pH неопходна за постизање максималне и репродуцибилне брзине хидролизе PLA помоћу Савиназе, у складу са претходном литературом.

Примена Савиназе на PLA предмете потрошачког квалитета даје губитак масе за све тестиране узорке у распону од 2% до 100%. Додатно, структурне промене PLA предмета након третмана Савиназом потврђене су FTIR анализом. У литератури је познато да кристалност, молекулска маса, термичка историја и начин процесирања могу утицати на приступачност полимерних ланаца ензиму. Стога, наши резултати заједно са доступном литературом истичи потребу да се приликом развоја PLA материјала за једнократну употребу, поред физичко-хемијских особина у обзир узме и њихов предвиђени начин разградње. Додатно, количина Савиназе могла је бити смањена на 0,1% масе PLA узорка без губитка ефикасности хидролизе.

Савиназа на 42 °C постиже деполимеризацију PLA упоредиву са Протеиназом K на 50 °C. Претходно је, међу 56 комерцијалних препарата протеаза, Протеиназа K била идентификована као најефикаснија за деполимеризацију PLA, док је Савиназа постигла 50% њене ефикасности (8). Наши резултати су потврдили да су претходно описани резултати последица извођења реакција на 50 °C, односно на температури оптималној за Протеиназу K, што додатно указује на значај поређења ензима у различитим реакционим условима.

Мономер и димер млечне киселине детектовани су као главни производи разградње у реакцијама и са Савиназом и са Протеиназом K, што указује на присуство и ендо- и егзо-типа хидролизе PLA, у складу са другим PLA-деполимеразама у литератури.

Мерењем активности Савиназе на различитим поли(естрима) потврђена је специфичност према PLA, без показане хидролизе PCL, PHO и PHB током 10 дана инкубације на 42 °C. Ова специфичност је различита од активности PLA-деполимераза типа II, као што су HiC и кутиназа из *Cryptococcus* sp., које могу хидролизовати и друге поли(естре) (10). Даљом анализом молекулског докинга Савиназе показано је да су у специфично препознавање PLA укључени аминокиселински остаци Asn155, Ser125, Ala152 и Leu217. Добијени резултати молекулске динамике били су у складу са експериментално утврђеним одсуством хидролизе PCL, PHB и PHO, а потврдили су могућност хидролизе PLA помоћу Савиназе.

Додатно, ултразвучни предтретман испитан је у циљу повећања приступачности PLA ензимској разградњи. Предтретман је довео до иницијалног повећања брзине разградње и унапређења конверзије PLA у мономер млечне киселине при 42 °C.

Сумирано, резултати ове дисертације показују да се унапређење биокаталитичке разградње PHA и PLA може постићи различитим, међусобно комплементарним приступима. За унапређење разградње PHA, протеинско инжењерство и ASR омогућили су побољшање супстратне специфичности и термостабилности PfPHOазе, док су PHO модел јединења омогућила брже и стандардизованије праћење специфичне активности. За унапређење разградње PLA, оптимизација реакционих услова, избор Савиназе као индустријски доступног ензима и ултразвучни предтретман омогућили су разградњу потрошачких PLA материјала и конверзију полимера у мономер млечне киселине. Ови резултати подржавају могућност пренамене већ постојећих индустријских биокатализатора и њиховог комбиновања са одговарајућим физичким предтретманима у развоју процеса за

контролисану разградњу биополимерног отпада и регенерацију мономерних јединица у производни циклус.

Литература:

1. Narancic T, Verstichel S, Reddy Chaganti S, Morales-Gamez L, Kenny ST, De Wilde B, et al. Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution. Environ Sci Technol. 2018 Sep 18;52(18):10441–52. doi:10.1021/acs.est.8b02963

2. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. Sci Adv. 2017 Jul 7;3(7):e1700782. doi:10.1126/sciadv.1700782

3. Tournier V, Topham CM, Gilles A, David B, Folgoas C, Moya-Leclair E, et al. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. Nature. 2020 Apr;580(7802):216–9. doi:10.1038/s41586-020-2149-4

4. Papaneophytou CP, Pantazaki AA, Kyriakidis DA. An extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase in Thermus thermophilus HB8. Appl Microbiol Biotechnol. 2009 Jun;83(4):659–68. doi:10.1007/s00253-008-1842-2 PubMed PMID: 19214501.

5. Mohanan N, Wong MCH, Budisa N, Levin DB. Polymer-Degrading Enzymes of Pseudomonas chloroaphis PA23 Display Broad Substrate Preferences. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Jan;24(5):4501. doi:10.3390/ijms24054501

6. Jendrossek D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Apr 1;74(6):1186–96. doi:10.1007/s00253-007-0860-9

7. Yamashita K, Kikkawa Y, Kurokawa K, Doi Y. Enzymatic degradation of poly(L-lactide) film by proteinase K: quartz crystal microbalance and atomic force microscopy study. Biomacromolecules. 2005;6(2):850–7. doi:10.1021/bm049395v PubMed PMID: 15762651.

8. Oda Y, Yonetsu A, Urakami T, Tonomura K. Degradation of Polylactide by Commercial Proteases. Journal of Polymers and the Environment. 2000 Jan 1;8:29–32. doi:10.1023/A:1010120128048

9. Shalem A, Yehezkeli O, Fishman A. Enzymatic degradation of polylactic acid (PLA). Appl Microbiol Biotechnol. 2024;108(1):413. doi:10.1007/s00253-024-13212-4 PubMed PMID: 38985324; PubMed Central PMCID: PMC11236915.

10. Kawai F, Nakadai K, Nishioka E, Nakajima H, Ohara H, Masaki K, et al. Different enantioselectivity of two types of poly(lactic acid) depolymerases toward poly(l-lactic acid) and poly(d-lactic acid). Polymer Degradation and Stability. 2011 Jul 1;96(7):1342–8. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2011.03.022

Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су три рада, од којих су два публикована у међународним часописима изузетних вредности (М21а) и један у водећем међународном часопису категорије (М21).

Међународни часопис изузетних вредности М21а:

1. **Nenadović, M.**, Ponjavić, M., Pantelic, B., Guzik, M., Majka, T. M., Sourkouni, G., Maršavelski, A., Nikodinović-Runić, J. (2025). Efficient Degradation of Consumer-Grade PLA by Commercial Savinase: Optimized Conditions and Molecular Dynamics Insights. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 13 (24), 9269. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5c03378, (IF_5=7,8; (2025))
2. **Nenadović, M.**, Maršavelski, A., Bogojević Škaro, S., Maslak, V., Nikodinović-Runić, J., Milovanović, J. (2024). New model compounds for the efficient colorimetric screening of medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) depolymerases reveal mechanism of activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 283 (3), 137672. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137672, (IF_5=8,7; (2024))

Врхунски међународни часопис М21:

1. Sourkouni, G., Jeremić, S., Kalogirou, C., Höfft, O., **Nenadović, M.**, Janković, V., Rajasekaran, D., Pandis, P., Padamati, R., Nikodinović-Runić, J., Argirusis, C. (2023). Study of PLA pre-treatment, enzymatic and model-compost degradation, and valorization of degradation products to bacterial nanocellulose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(6), 161. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03605-4, (IF_5=4,3; (2023))

Научна саопштења са међународних научних скупова штампана у изводу М34:

1. **Nenadović, M.**, Ponjavić, M., Pantelić, B., Jeremić, S., Guzik, M., Maršavelski, A., Nikodinović-Runić, J. (2025). Recovery of PLA Building Blocks from Single-Use PLA Waste with Commercial Savinase. Book of Abstracts of the 12th European Symposium on Biopolymers. p. 190, October, Lisbon, Portugal
2. **Nenadović, M.**, Ponjavić, M., Pantelić, B., Mojićević, M., Nikodinović-Runić, J. (2024). PHB and PHB-PHO Composites with Immobilized *Streptomyces* DG19 Spores for Enhanced Polymer Biodegradation. Book of Abstracts of the 19th International Symposium on Biopolymers. Frontiers. p. 81, October, Penang Island, Malaysia
3. **Nenadović, M.**, Milovanović, J., Maslak, V., Nikodinović-Runić, J. (2024). Establishing high-throughput screening of engineered polyhydroxyoctanoate (PHO) depolymerase variants using novel PHO model compounds. Book of Abstracts of the 48th FEBS Congress, P--20--005, June, Milano, Italy
4. **Nenadović, M.**, Pantelić, B., Lazić, J., Maslak, V., Nikodinović-Runić, J., Milovanović, J. (2023). Medium chain length polyhyoxyalkanoates (mcl-PHA) model compounds for the discovery of novel PHA depolymerases. Book of Abstracts of the 10th International Conference MIKROBIOKOSMOS. PP123, November, Larissa, Greece

5. **Nenadović, M.**, Pantelić, B., Ponjavić, M., Nikodinović-Runić, J. (2023). Exploring PhaZ depolymerase sequence space for the bio-cyclable loop for biopolymers. Book of Abstracts of the 9th Symposium Chemistry and Environmental Protection, p. 195-196, June, Kladovo, Serbia

Научна саопштења са националних научних скупова штампана у изводу М64:

1. **Nenadović, M.**, Celebi-Olcum, N., Milovanović, J., Nikodinović-Runić, J. (2026). Molecular docking screening of PHA model compounds for the development of specific enzyme detection assays for enhanced PHA degradation. Book of Abstracts of DNA Connection – Student Symposium Celebrating DNA Day, p. 27, April, Belgrade, Serbia
2. **Nenadović, M.**, Nikodinović-Runić, J., Milovanović, J., Jeremić, S. (2022). PhaZ expression optimization for improved enzymatic polyhydroxyalkanoates degradation. Book of Abstracts of the 8th Conference of Young Chemists of Serbia. p. 57, October, Belgrade, Serbia

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације „Унапређење биокаталитичке разградње биополимера поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине)", аутора Марије (Радивој) Кокић је проверена 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 утврђено је да подударање текста износи 6%. У извештају је регистровано укупно 88 извора подударности и то са подударношћу мањом од 1% у свим случајевима.

Овај степен подударности последица је универзалних скраћеница, назива једињења, цитата, дефиниција и описа коришћених експерименталних метода, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација Марије Кокић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

На основу приказаних података и резултата, Комисија је закључила да је у поднетој дисертацији под називом „Унапређење биокаталитичке разградње биополимера поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине)", кандидаткиња Марија (Радивој) Кокић успешно одговорила на све задате циљеве. Комисија је мишљења да је дисертација резултат самосталног и оригиналног истраживачког рада кандидаткиње, те да добијени резултати представљају значајан научни допринос у области Биохемије.

У оквиру истраживања изведеног током израде ове докторске дисертације развијене су и окарактерисане нове варијанте PHO-деполимеразе пореклом из *Pseudomonas fluorescens* GK13, при чему је показано да реконструкција предачких секвенци представља ефикасну стратегију за истовремено унапређење термостабилности и специфичности овог ензима. Комбиновањем експерименталних и рачунарских приступа идентификовани су

аминокиселински остаци значајни за специфично препознавање PHO, као и позиције чија промена доводи до губитка ензимске активности.

Посебан допринос представља увођење pNP-PHO-мономера и димера као модел једињења за карактеризацију PHO-деполимераза, чиме је омогућено специфичније и једноставније праћење ензимске активности, укључујући и праћење активности у присуству детерџената које није могуће са PHO. Тиме је додатно проширена примена модел једињења у проучавању ензима за биокаталитичку разградњу полимерних материјала.

У другом делу дисертације утврђени су оптимални услови за разградњу PLA применом Савиназе, индустријски доступног ензима, при чему је показана њена висока специфичност према PLA и одсуство активности према другим испитиваним поли(естрима). Идентификовани су аминокиселински остаци који доприносе специфичном препознавању PLA, док је испитивањем потрошачких узорака показано да начин процесуирања полимера значајно утиче на његову подложност ензимској разградњи. Додатно, предтретман ултразвуком убрзао је разградњу PLA и унапредио конверзију до мономера млечне киселине у мезофилним условима.

Резултати ове дисертације истичу значај комбиновања протеинског инжењерства, примене модел једињења, предтретмана полимера и оптимизације реакционих услова за развој ефикасних процеса контролисане биокаталитичке разградње биополимера. Посебно је значајан показан потенцијал већ постојећих индустријских ензима за пренамену у разградњи пластичног отпада.

Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације до сада су објављени у оквиру два научна рада штампана у међународним научним часописима из категорије M21a, у којима је кандидаткиња први аутор, као и једног рада у часопису категорије M21 у ком је кандидаткиња коаутор.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду да прихвати поднету докторску дисертацију Марије Кокић, мастер биохемичара, под насловом „Унапређење биокаталитичке разградње биополимера поли(хидроксиалканоата) и поли(млечне киселине)“ за стицање звања доктора биохемијских наука, као и да одобри њену јавну одбрану.

У Београду, 8.10.2026.

КОМИСИЈА

_____

др Веселин Маслак, редовни професор (председник Комисије),
Хемијски факултет,
Универзитет у Београду

_____

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

_____

др Владимир Бешкоски, редовни професор,
Хемијски факултет,
Универзитет у Београду

_____

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

_____

др Марија Љешевић, виши научни сарадник,
Институт за хемију, технологију и металургију,
Институт од националног значаја за Републику Србију,
Универзитет у Београду