

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

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

**„Production of fructose and aldonic acids by immobilized coupled enzymatic systems based on recombinant A2 mutant of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and H5 mutant of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* “**

**„Производња фруктозе и алдонских киселина имобилизованим куплованим ензимским системима заснованим на рекомбинантном А2 мутанту глукоза оксидазе из *Aspergillus niger* и H5 мутанта целобиоза дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* “**

**Образложење теме докторске дисертације:**

**1. Научна област:** Хемија

**Ужа научна област:** Биохемија

**2. Предмет научног истраживања**

Истраживања планирана у оквиру ове докторске дисертације обухватају производњу и експресију рекомбинантног мутанта H5 из *Phanerochaete chrysosporium* у квасци *Pichia pastoris* KM71H и пречишћавање добијеног рекомбинантног протеина. Такође се планира и експресија A2 мутанта глукоза оксидазе из *Aspergillus niger* и његово приказивање на површини ћелија квасца *Saccharomyces cerevisiae* EBY100. Ћелије квасца са глукоза оксидазом на површини ћелијског зида би се лизирале толуолом и добијени ћелијски зидови умрежили глутарладехидом. Добијени пречишћени мутант целобиоза дехидрогеназе би се у куплованом ензимском систему са лаказом искористио

за производњу лактобионске киселине, док би се умрежени ћелијски зидови квасца који у себи садрже A2 мутант глукоза оксидазе, инвертазу и каталазу из квасца искористиле за хидролизу сахарозе и оксидацију глукозе до глуконске киселине чиме би се у једном кораку произвеле фруктоза и глуконска киселина. Са индустријске тачке гледишта би се добијени биокатализатори могли искористити за производњу фруктозе и алдонских киселина.

### **3. Основне хипотезе**

**Глукоза оксидаза** је ензим који може да оксидује глукозу до глуконске киселин уз помоћ кисеоника и ослобађање водоник пероксида. A2 мутант који би се искористио има повећану активност у односу на природни облик ензима. Да би се спречила инактивација глукоза оксидазе водоник пероксидом каталаза присутна у ћелијама квасца услед своје молекулске масе би након лизе толуолом била задржана у ћелијским зидовима умрежавањем глутаралдехидом. На тај начин би се добио купловани ензимски систем глукоза оксидаза каталаз који се до сада показао као ефикасан у производњи глуконске киселине (1). Обзиром да се у ћелијском зиду пекарског квасца налази и инвертаза која хидролизује сахарозу као јефтину индустријску сировину у фруктозу и глукозу (2) на овај начин би се добио имобилизовани купловани ензимски систем који се показао као погодан за производњу поред глуконске киселине и фруктозе (3,4)

**Целобиозо дехидрогеназа** је ензим који може да оксидује лактозу уз помоћ акцептора електрона као што је 2,6-дихлоро индофенол до лактобионске киселине (5) Мутант H5 поседује повећану активност и ефикасност у конверзију лактозе до лактобионске киселин (6) и уз употребу лаказе се редуковани 2,6-дихлоро индофенол може поново оксидовати молекулским кисеоником уз помоћ лаказе, чиме се добија купловани ензимски систем за производњу лактобионске киселине из лактозе (7).

**Алдобионске киселине**, се могу користити у различитим гранама индустрије и медицине. Тако се на пример користе као адитив за стабилизацију органа током трансплатације због особине да хелирају метале и редукују оксидативни стрес и оштећење ткива за време складиштења органа (8)

**Протеински инжењеринг** подразумева промену секвенце гена који кодира одређену аминокиселинску секвенцу протеина у циљу промене протеинске активности и стабилности (9). Протеински инжењеринг се може искористити и за добијање рекомбинантних ензима имобилизованих на површини ћелија квасца чиме се добија природно имобилизован биокатализатор који претходним процесом мутација и селекција има повећану активност у односу на природни облик ензима. На тај начин имобилизован ензим има нижу цену добијања, могућност регенерације као и олакшане употребе мултиензимских система сличних системима који се користе у метаболичком инжењерингу (10)

#### **4. Циљ истраживања и очекивани резултати:**

Циљ ове докторске дисертације је развој нових куплованих мултиензимских система за производњу лактобионске киселине из лактозе, као и глукокске киселине и фруктозе из сахарозе употребом протеинског инжењеринга и имобилизацијом умрежавањем глутаралдехидом. Добијени купловани мултиензимски системи би имали пошљшане оперативне перформансе за добијање алдонских киселина и фруктозе у вишеструким циклусима употребе.

Специфични циљеви докторске дисертације обухватају:

- Експресија мутаната глукоза оксидазе А2 повећане активности и специфичности ка глукози и негова имобилизација на површини ћелија квасца
- Експресија и пречишћавање мутаната целобиоза дехидрогеназе повећане активности у односу на природни облик ензима;
- Развој куплованог ензимског система глукоза оксидаза-каталаза-инвертаза имобилизованог у ћелијским зидовима квасца
- Развој куплованог ензимског система целобиоза дехидрогеназе и лаказа за производњу лактобионске киселине
- физичко-хемијска и кинетичка карактеризација добијених куплованих ензимских система;
- одређивање оперативних перформанси имобилизованих биокатализатора
- испитивање могућности вишеструке употребе имобилизованих биокатализатора за производњу алдонских киселина

## 5. Методе истраживања

Током израде ове докторске тезе биће коришћене следеће методе и експерименталне технике:

- 1) **Хемијске методе:** Хемијска модификација глутаралдехидом
- 2) **Инструменталне методе:** УВ/ВИС спектрофотометрија за мерење ензимске активности имобилизованих и неимобилизованих ензима.
- 3) **Биохемијске методе:** хроматографске методе пречишћавања протеина, натријум-додецилсулфат полиакриламидна (SDS-PAGE) електрофореза и изоелектрично фокусирање за проверу успешности пречишћавања ензима.
- 4) **Методе молекуларне биологије:** изоловање плаزمида из бактерија и трансформација квасаца добијеним плазмидима.
- 5) **Микробиолошке методе:** методе за гајење ћелија квасаца и бактерија.

## 6. Литература

1. Godjevargova, T., R. Dayal, and S. Turmanova, Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. 2004. *Macromol Biosci.* 2004 Oct 20;4(10): 950-6. doi: 10.1002/mabi.200400058. *Macromolecular Bioscience.*
2. A. Uroš, P. Srdjan, Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. 2010(3): p. 799804. 2010(3) 799804. *Food.*
3. A.C. Mafra, et al., Gluconic acid production from sucrose in an airlift reactor using a multi-enzyme system, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 38 (4) (2015) 671–680
4. F.A. Taraboulsi, E.J. Tomotani, M. Vitolo, Multienzymatic sucrose conversion into fructose and gluconic acid through fed-batch and membrane-continuous processes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165 (7–8) (2011) 1708–1724.
5. Van Hecke W, et al. 2009. Bubble-free oxygenation of a bienzymatic system: effect on biocatalyst stability. *Biotechnol Bioeng.* 102(1):122–131.
6. Balaz AMJ, BM, Popovic N, Prodanovic OL, Ostafe RV, Fischer R, Prodanovic RM.

2020. Expression, purification and characterization of cellobiose dehydrogenase mutants from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris* KM71H strain. *J Serb Chem Soc.* 85(1):10.
7. Splechna B, et al. 2001. Production of a lactose-free galactooligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. *Enzyme Microb Technol.* 29(6):434–440.
  8. Guibert EE, et al. 2011. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfus Med Hemother.* 38(2):125–142.
  9. Blazic M, et al. 2019. Directed evolution of cellobiose dehydrogenase on the surface of yeast cells using resazurin-based fluorescent assay. *Appl Sci.* 9(7):1413.
  10. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 10 January 2022 Sec. Industrial Biotechnology Volume 9 - 2021 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794742>