

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

**Предмет:** Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње **Марије Д. Стефановић**, мастер биохемичара, пријављене под насловом „Идентификација, карактеризација и клонирање нове бактеријске протеазе за ензимску хидролизу глутена”

**1. Научна област:** Хемијске науке

**Ужа научна област:** Биохемија

**2. Предмет научног истраживања**

Предмет научног истраживања докторске дисертације обухвата претрагу, идентификацију, карактеризацију бактеријских протеаза и испитивање њихове потенцијалне примене у контролисаном уклањању глутена.

Први део ове тезе усмерен је на идентификацију и селекцију домаћих бактерија које производе екстрацелуларне протеазе активне према глутену и његовим фракцијама. Најактивнији сој биће даље коришћен за добијање протеазе ферментационим техникама, која ће онда бити пречишћена до хомогености, идентификована и биохемијски окарактерисана. Добијеном ензимском препарату биће одређена ендопротеазна, егзопротеазна и пролил-ендопротеазна активност. Додатно ће бити одређени кинетички параметри и специфичност ензима према синтетичким хромогеним супстратима. Конформациона покретљивост ензима и потенцијалне интеракције са карактеристичним мотивима у глутену биће предвиђене симулацијама молекулске динамике. Техникама молекулског клонирања биће успостављен систем за стабилну рекомбинантну производњу одабране протеазе како би се постигли већи приноси. Два прокариотска експресиона система (*E. coli* и *B. subtilis*) ће бити испитана, а затим оптимизовани експресиони услови за добијање високог приноса рекомбинантне протеазе.

Други део тезе усмерен је на испитивање потенцијала добијеног ензимског препарата на бази нове протеазе за ефикасну хидролизу глутена и смањење имунореактивности брашна житарица (пшеница и тритикале). Прво ће бити испитана способност хидролизе глутена и његових фракција у суспензији, а проценат хидролизе ће бити праћен спектрофотометријским, електрофоретским и хроматографским методама. Имунореактивност добијених хидролизата биће одређена имунохемијским методама. Додатно ће бити испитана ефикасност хидролизе других релевантних слабо растворних протеина у житарицама (зеин, хордеин, секалин). Након тога, биће испитана способност хидролизе на реалним узорцима брашна. Експериментални услови ензимског третмана биће оптимизовани са циљем значајног смањења концентрације имунодоминантних епитопа. Активност препарата протеазе биће упоређена са активношћу комерцијалних протеаза традиционално коришћених у прехранбеној индустрији.

### 3. Основне хипотезе

Глутен представља гумасту и еластичну масу која заостаје након уклањања скроба из брашна житарица. Обухвата 70-80% укупних протеина семена житарица и представљају основну резерву азота у ендосперму, неопходног за герминацију и развијање младог клијанца<sup>1</sup>. Ови протеини доприносе јединственим особинама теста, дајући кохезивност, вискозност и карактеристичну еластичност пекарским производима од пшеничног брашна<sup>1,2</sup>. Глутен се састоји од стотина протеинских фракција које су повезане интра- и интерланчаним дисулфидним везама, што га чини једним од најсложенијих протеинских агрегата у природи. Квантитативни и квалитативни састав глутенских протеина одређен је генетичким и факторима средине, а њихово проучавање и раздвајање захтева софистициране аналитичке технике<sup>1</sup>. Према растворљивости, глутенски протеини деле се на две главне фракције: у разблаженом алкохолу растворљиве глијадине и нерастворне полимерне глутелине, који се могу екстраховати веома алкалним растворима уз редукацију дисулфидних веза. Ови протеини су јединствени по свом аминокиселинском саставу, који карактеришу високи садржаји понављајућих секвенција богатих глутамином и пролином и низак садржај наелектрисаних остатака, што доприноси нерастворљивости, смањеној флексибилности глутена и отпорности на протеолизу у гастроинтестиналном тракту<sup>1</sup>.

Прехрамбени производи од пшенице, јечма и ражи су богати глутеном и чине основу савремене исхране. Међутим, код предиспонираних особа изложеност глутену изазива осетљивост повезану са пшеницом (енгл. *wheat-related disorders*), у које спадају аутоимунска целијачна болест, алергија на пшеницу и нецелијачна осетљивост на глутен<sup>3,4</sup>. Сматра се да јединствени репетитивни мотиви, заступљени у свим глутенским фракцијама, доводе до покретања имунског одговора код осетљивих особа; до сада је идентификован 31 Т-ћелијски епитоп који се доводи у везу са целијачном болести<sup>4</sup>. Уколико се не дијагностикују и не третирају, ови поремећаји доводе до хроничних гастроинтестиналних проблема и лоше апсорпције нутријената, због чега значајно нарушавају квалитет живота. За сада најчешћа терапија за ове поремећаје је стриктна безглутенска исхрана. Глутен је чест контаминант прехранбених производа, због чега је одржавање овакве исхране изазов. Према међународним смерницама, комерцијално доступни безглутенски производи морају садржати мање од 20 mg/kg глутена да би се класификовали као безбедни за пацијенте са осетљивошћу на глутен<sup>2</sup>. Дугорочне студије показују да безглутенска исхрана може довести до недостатка хранљивих влакана, калцијума, гвожђа, фолата и других витамина<sup>5</sup>. Производи од природно безглутенских житарица, као што су пиринач, кукуруз, хељда, просо и оvas, ограничено су доступни, имају лошије органолептичке особине и скупљи су од оних који садрже глутен<sup>6</sup>. Како би задржали добар укус и пожељне сензорне карактеристике, индустријски безглутенски производи често садрже више простих шећера и масти<sup>5</sup>. Због тога, истраживања су усмерена ка развоју нових техника прераде житарица како би се елиминисала имунореактивност глутена, а задржала пожељна нутритивна и технолошка својства пшеничног, јечменог и ражаног брашна.

Ензимски третман брашна омогућава ефикасну, контролисану и циљану хидролизу глутена у благим и еколошки прихватљивим условима. Протеазе (пептидазе или протеиназе) су структурно и еволутивно разноврсни ензими који катализују хидролизу пептидне везе ослобађајући пептидне фрагменте или слободне аминокиселине. Према специфичности деловања у односу на положај у полипептидној кичми супстрата деле се на егзопротеазе, које катализују хидролизу терминалне пептидне везе, и ендопротеазе,

које катализују хидролизу везе у унутрашњости ланца<sup>7</sup>. Критеријуми за примену протеаза које разграђују глутен током прераде хране подразумевају да ензими буду безбедни за употребу у прехранбеној индустрији и усклађени са законским регулативама, да задржавају стабилност и активност у различитим условима обраде, као и да је њихово добијање економски исплативо и да се могу лако уклопити у постојеће индустријске процесе<sup>6</sup>. За овакву примену и елиминисање имунореактивности глутена неопходно је пронаћи протеазу која ефикасно и специфично хидролизује пептидну везу иза PQ мотива у глутену. До сада је идентификовано више протеаза биљног (EP-B2 протеаза из јечма), фунгалног (AN-PEP из *Aspergillus niger*) и бактеријског (S8 протеаза из *Rothia mucilagenos*) порекла које су показале способност хидролизе глутена и по каталитичком механизму сврставају се у аспартатне протеазе (A1 фамилија), цистеинске протеазе (S1 фамилија), металопротеазе (M4 фамилија) и серинске протеазе (S8, S9 или S53 фамилија)<sup>6,8</sup>. Микробне протеазе заузимају значајан део тржишта индустријских ензима због високе активности и стабилности, једноставне генетичке манипулације, високог приноса и исплативе производње, као и због могућности примене у различитим технолошким процесима. Међу произвођачима микробних протеаза, издваја се род *Bacillus* због високог капацитета за секрецију индустријски значајних хидролаза. *Bacillus subtilis* експримира осам екстрацелуларних протеаза које се по каталитичком механизму сврставају у серинске и металопротеазе и активне су у базним или неутралним условима. Протеазе AprE и NprE чине више од 95% протеолитичке активности у ферментационој течности<sup>9</sup>. Ови ензими имају велику комерцијалну примену због високе каталитичке ефикасности и широке супстратне специфичности, док се сојеви који их производе сматрају безбедним за употребу (енгл. *Generally Recognised As Safe, GRAS*). Високи приноси ензима неопходни за индустријске потребе постижу се производњом рекомбинантних ензима, што у случају производње протеаза може представљати главно уско грло услед потенцијалне токсичности за ћелије домаћина и лоше експресије, подложности аутопротеолизи и компликоване постферментационе обраде<sup>7</sup>.

#### 4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Циљ ове дисертације је идентификација и карактеризација нове протеазе са потенцијалном применом у контролисаној хидролизи глутена.

Сходно томе, дефинисани су следећи циљеви:

1. Претрага лабораторијске колекције изолата *Bacillus* spp. и идентификација произвођача протеаза активних према глијадину и глутену помоћу брзог дифузионог теста;
2. Оптимизација услова за производњу бактеријске протеазе у претходно одабраном соју;
3. Пречишћавање и биохемијска карактеризација нове протеазе – одређивање молекулске масе, секвенције, изоелектричне тачке, температурног и рН оптимума, температурне и рН стабилности;
4. Одређивање кинетичких параметара ензима у реакцији са синтетичким хромогеним супстратима (N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NA и N-Suc-Ala-Ala-Val-Ala-p-NA); одређивање утицаја инхибитора, металних јона и адитива на ензимску реакцију;

5. Клонирање и оптимизација рекомбинантне експресије нове протеазе у системима *E. coli* и *B. subtilis*; оптимизовање продукције ензима у ерленмајерима уз константно мешање (енгл. *shake-flask*) или на скали од једног литра семиконтинуалном ферментацијом уз додавање супстрата (енгл. *fed-batch*) за добијање високог приноса;
6. Оптимизација електрофоретских и хроматографских метода за праћење тока хидролизе и анализу производа хидролизе глијадина и глутена;
7. Одређивање активности протеазе према консензусном 33-мер имунодоминантном пептиду из  $\alpha 2$ -глијадинске фракције који садржи преклапајуће Т-ћелијске епитопе;

## 5. Методе истраживања

За гајење бактерија и производњу ензима биће коришћене основне микробиолошке методе и ферментационе технике у течној подлози. За претрагу сојева који производе протеазе у лабораторијској колекцији микроорганизама користиће се брзи дифузиони тест на чврстој подлози са инкорпорираним супстратом. Сојеви ће бити селектовани на основу пречника зоне хидролизе, а онда идентификовани геномским секвенцирањем.

За пречишћавање ензима из ферментационе течности биће коришћене преципитационе и хроматографске технике. Степен пречишћености и хомогеност добијеног препарата биће праћени натријум-додecilсулфат електрофорезом у полиакриламидном гелу (SDS-PAGE). За одређивање протеолитичке активности у фракцијама биће коришћени спектрофотометријски есеји и зимограмске технике (ренатурациона електрофореза у гелу са инкорпорираним супстратом и изоелектрично фокусирање са носећим амфолитима праћено контактним зимограмом). Ензим ће бити идентификован масеном спектрометријом. На основу добијене секвенције биће конструисани модели тродимензионалне структуре (AlphaFold2) који ће бити коришћени даље за компјутерске симулације молекулске динамике ензима и његових интеракција са репрезентативним епитопима глутена у GROMACS програму.

За биохемијску карактеризацију ензима биће коришћени спектрофотометријски есеји са растворним супстратима. За одређивање ендпротеазне активности као супстрати биће коришћени казеин или азоказеин, за одређивање егзопротеазне активности L-Leu-*p*-NA, а за одређивање пролил-ендопротеазне активности Z-Gly-Pro-*p*-NA. Кинетички параметари биће одређени спектрофотометријским есејима са N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-NA и N-Suc-Ala-Ala-Val-Ala-*p*-NA. Активност препарата протеазе биће упоређена са активношћу комерцијалних протеаза традиционално коришћених у прехранбеној индустрији.

Технике молекулског клонирања биће употребљене за успостављање рекомбинантне експресије ензима. Изаловаће се укупна DNA бактерија и амплификовати ген од интереса ланчаном реакцијом полимеразе (PCR), а затим клонирати у експресиони вектор методом рестрикције и лигације. Добијеним конструктом биће трансформисане хемијске компетентне ћелије домаћина (*E. coli* и *B. subtilis*). Трансформанти ће бити селектовани на подлози са погодним антибиотиком, а успешност клонирања биће проверена методом *colony PCR*. Рекомбинантни ензим ће бити експримиран ферментацијом у ерленмајерима уз константно мешање (енгл. *shake-flask*) или

ферментацијом у семиконтинуалном моду уз додавање супстрата (енгл. *fed-batch*) у оптимизованим условима.

Процент ензимске хидролизе глутена и глијадина из пшенице и тритикалеа биће одређен на основу промене концентрације слободних аминокиселина група спектрофотометријским есејима са 2,4,6-тринитробензенсулфонском киселином (TNBSA) или *o*-фталалдехидом (OPA). Глутен и глијадин из тритикалеа ће бити изоловани методом секвенцијалне екстракције брашна по Озборну<sup>10</sup>. Ток хидролизе ће бити праћен електрофоретским (SDS-PAGE) и хроматографским техникама (реверзно-фазна хроматографија (RP-HPLC) и гел хроматографија (SEC)). Активност протеазе биће одређена према комерцијалном консензусном 33-мер имунодоминантном пептиду из  $\alpha$ 2-глијадинске фракције хроматографским техникама (RP-HPLC). Концентрација имунодоминантних епитопа у хидролизатима биће одређена комерцијалним компетитивним ензимским имуносорбентним есејем (ELISA).

## 6. Литература

- (1) Wieser, H.; Koehler, P.; Scherf, K. A. Chemistry of Wheat Gluten Proteins: Qualitative Composition. *Cereal Chemistry* **2023**, *100* (1), 23–35. <https://doi.org/10.1002/cche.10572>.
- (2) Wieser, H.; Koehler, P.; Scherf, K. A. Chemistry of Wheat Gluten Proteins: Quantitative Composition. *Cereal Chemistry* **2023**, *100* (1), 36–55. <https://doi.org/10.1002/cche.10553>.
- (3) Wieser, H.; Koehler, P.; Scherf, K. A. The Two Faces of Wheat. *Front Nutr* **2020**, *7*, 517313. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.517313>.
- (4) Catassi, C.; Verdu, E. F.; Bai, J. C.; Lionetti, E. Coeliac Disease. *The Lancet* **2022**, *399* (10344), 2413–2426. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00794-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00794-2).
- (5) Ludvigsson, J. F.; Yao, J.; Lebwohl, B.; Green, P. H. R.; Yuan, S.; Leffler, D. A. Coeliac Disease: Complications and Comorbidities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2025**. <https://doi.org/10.1038/s41575-024-01032-w>.
- (6) Scherf, K. A.; Wieser, H.; Koehler, P. Novel Approaches for Enzymatic Gluten Degradation to Create High-Quality Gluten-Free Products. *Food Research International* **2018**, *110*, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.021>.
- (7) Srivastava, N.; Khare, S. K. Advances in Microbial Alkaline Proteases: Addressing Industrial Bottlenecks Through Genetic and Enzyme Engineering. *Appl Biochem Biotechnol* **2025**, *197* (8), 4861–4896. <https://doi.org/10.1007/s12010-025-05270-9>.
- (8) Liu, Y.-Y.; Lin, I.-C.; Chen, P.-C.; Lee, C.-C.; Meng, M. Crystal Structure of a *Burkholderia* Peptidase and Modification of the Substrate-Binding Site for Enhanced Hydrolytic Activity toward Gluten-Derived pro-Immunogenic Peptides. *International Journal of Biological Macromolecules* **2022**, *222*, 2258–2269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.016>.
- (9) Harwood, C. R.; Kikuchi, Y. The Ins and Outs of Bacillus Proteases: Activities, Functions and Commercial Significance. *FEMS Microbiol Rev* **2021**, *46* (1), fuab046. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab046>.
- (10) Chen, G.; Stump, M.; Li, Y. Protein Fractionation Using Osborne Sequential Extraction. In *Plant-Based Proteins: Production, Physicochemical, Functional, and Sensory Properties*; Li, Y., Ed.; Springer US: New York, NY, 2025; pp 69–74. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4272-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4272-6_6).